

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e Cycle)
DE SCIENCES BIOLOGIQUES (Biologie Végétale)

par

Bernadette BOUTARD

Contribution à l'étude des Flavonoïdes de Potamogeton natans L. et autres Fluviales

Soutenue le 19 Mai 1972 devant la Commission d'Examen :

R. KUHNER Président

Ph. LEBRETON

J. CHOPIN

P. BERTHET

} Examineurs

Service de Phytochimie et Phytobiologie

U E R des Sciences de la Nature

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD DE LYON

pour obtenir

LE DIPLOME DE DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (3^e Cycle)
DE SCIENCES BIOLOGIQUES (Biologie Végétale)

par

Bernadette BOUTARD

Contribution à l'étude des Flavonoïdes de Potamogeton natans L. et autres Fluviales

Soutenue le 19 Mai 1972 devant la Commission d'Examen :

R. KUHNER Président

Ph. LEBRETON	}	Examineurs
J. CHOPIN		
P. BERTHET		

Service de Phytochimie et Phytobiologie

U E R des Sciences de la Nature

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : M. le Professeur J. BOIDIN.

1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences agrégé.

2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant.

3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche
U.E.R. médicale Alexis-Carrel
U.E.R. médicale LYON-Nord
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest
U.E.R. des Sciences pharmaceutiques
U.E.R. des Techniques de Réadaptation
U.E.R. de Biologie humaine
U.E.R. d'Education Physique et Sportive
U.E.R. des Sciences Odontologiques
U.E.R. de Mathématiques
U.E.R. de Physique
U.E.R. de Chimie et Biochimie
U.E.R. des Sciences de la Nature
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie
U.E.R. de Physique Nucléaire
U.E.R. de Mécanique
Observatoire
Institut Universitaire de Technologie 1
Institut Universitaire de Technologie 2

M. le Professeur D. GERMAIN
M. le Professeur C. GIROD
M. le Professeur A. BERTOYE
M. le Professeur L. TOLOT
M. M. CARRAZ, Maître de Conférences agrégé
M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences agrégé
M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
M. R. VINCENT
M. le Doyen J. BRACONNIER
M. le Professeur M. DUFAY
Mlle le Professeur D. GAUTHERON
M. le Professeur L. DAVID
M. le Professeur R. FONTANGES
M. le Professeur A. SARAZIN
M. le Professeur J. MATHIEU
M. le Professeur J. H. BIGAY
M. le Professeur B. POUYET
M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE.

A mes parents

A Michel

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de Biologie Végétale et de Chimie Biologique de l'Université Claude Bernard de Lyon.

Je voudrais assurer de toute ma reconnaissance Monsieur le Professeur KUHNER qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et qui a accepté de présider la commission d'examen.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur CHOPIN pour tout l'intérêt qu'il a porté à cette étude ; durant mon séjour dans son laboratoire, ses conseils et ses encouragements m'ont été fort utiles pour mener à terme mes travaux.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur BERTHET, Maître de Conférences, pour avoir accepté de faire partie du jury, et pour m'avoir permis de ramasser de nombreux échantillons dans le jardin botanique du Parc de la Tête d'Or qu'il dirige, et in natura.

Il m'est particulièrement agréable de pouvoir exprimer ici ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur LEBRETON, d'une part pour avoir bien voulu m'accueillir parmi ses chercheurs après un enseignement dans le cadre du Diplôme d'Etudes Approfondies de Physiologie Végétale, d'autre part pour avoir guidé pas à pas et suivi l'évolution de cette étude lors de nombreuses et fructueuses discussions qui m'ont permis de bénéficier de son expérience dans le domaine de la phytochimie.

Je tiens à remercier très sincèrement Mademoiselle BOUILLANT qui m'a initiée aux techniques d'analyse structurale des C-glucosylflavones. C'est avec beaucoup de gentillesse qu'elle m'a fait part de son expérience sur ce sujet, et la collaboration qui en a résulté a été très favorable à l'évolution de ce travail.

Les Laboratoires SARGET m'ont donné la possibilité de rédiger et de soutenir ce mémoire ; je tiens à en remercier très vivement leur Directeur Général, Monsieur NEGREVERGNE.

Enfin que tous les chercheurs et techniciens de l'équipe de Phytochimie et du laboratoire de Chimie biologique trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour leur aide, leurs conseils et surtout pour le climat de sympathique collaboration qui règne dans ces équipes de recherches.

... "Vous connaissez les Potamots et leurs espèces variées, tribu élégante, projetant au sein des eaux ses ramules pleins de caprices, étalant à la surface les disques oblongs de ses feuilles mordorées.

S'ils répudiaient leur manie d'embrasser les jambes du nageur de leurs ficelles, les Potamots seraient tous incontestablement des plantes rangées, vivant en famille dans un domicile fixe et précis. Seul parmi eux le Potamogeton natans est un bohème, ne fixant nulle part sa racine atrophiée et ses suçoirs ambulatoires de Juif-errant, embossé au gré des vents, tantôt à Saint-Pierre, tantôt à Charavines. C'est un Potamot Zingari."

(extrait de ALPINUS, Conteur Dauphinois, 1874).

INTRODUCTION

Comme leur nom l'indique, les Fluviales sont un ensemble végétal présentant un mode de vie aquatique ; elles ont constitué notre matériel d'étude pour deux raisons principales :

- d'une part, les recherches effectuées sur les Flavonoïdes des Hélobiées (= Fluviales) se trouvant apparemment fort restreintes, leur étude présentait à cet égard un intérêt biochimique certain ;
- d'autre part, les différentes classifications proposées ici par les botanistes reposant essentiellement sur des données morphologiques, l'apport de documents nouveaux ne pouvait que contribuer à une connaissance plus approfondie de la systématique de cet ensemble.

Des travaux antérieurs effectués au Laboratoire ont été réalisés dans la même optique (COMBIER, JAY, VOIRIN) : les auteurs ont tenté de préciser la taxinomie de certains grands groupes (Crassulacées, Saxifragacées, Ptéridophytes) à la lumière de leurs résultats biochimiques.

L'ensemble de notre travail peut se résumer de la façon suivante :

- dans un premier chapitre, nous décrivons les techniques habituellement utilisées au Laboratoire pour la mise en évidence des flavonoïdes. Nous y avons ajouté un procédé d'analyse systématique des C-glycosylflavones, type de composés largement répandus dans le groupe d'Angiospermes envisagé.
- nous avons consacré notre second chapitre à une espèce particulièrement riche en flavones et C-glycoflavones : Potamogeton natans L. . L'étude de ses glycosides nous a conduite, d'une part à l'identification d'une substance nouvelle, l'isoscoparoside, d'autre part à la mise en évidence de deux composés jusqu'alors inconnus à l'état naturel, pour lesquels l'élucidation des structures nécessite des recherches complémentaires, celles-ci étant d'ailleurs en cours.
- dans le troisième chapitre, nous exposons parallèlement les résultats des analyses flavoniques de vingt-trois Fluviales et de quatre végétaux aquatiques extérieurs à ce groupe, et les données bibliographiques concernant les Angiospermes aquatiques.
- enfin, dans le dernier chapitre, nous avons tenté de définir le profil flavonique moyen des Fluviales à l'aide de nos résultats ; nous avons comparé ces résultats aux données anatomiques et morphologiques classiques, aussi bien sous l'angle de la systématique "statique" que celui de la phylogénie. Ceci nous a permis une discussion plus fine de la définition des différentes familles des Fluviales et une meilleure appréciation de la situation de ce groupe dans le contexte des Angiospermes.

CHAPITRE I

Matériel et Techniques

Nous exposerons ici l'ensemble des données concernant l'aspect pratique de notre travail de recherche ; nous parlerons successivement :

- des Fluviales, famille végétale constituant notre centre d'attention ; nous citerons aussi quelques plantes étrangères à l'Ordre, étudiées dans l'espoir de faire la part des influences respectives de l'habitat et de la position systématique sur la composition biochimique ;
- de la technique d'analyse flavonique proprement dite, puisque nous nous proposons d'adopter un point de vue systématique basé sur le contenu flavonique des espèces.

I - 1 MATERIEL BIOLOGIQUE

I - 1. 1. Les Fluviales (d'après EMBERGER, 1960)

Ce groupe de Monocotylédones, entièrement constitué d'Hydrophytes, s'étend d'espèces totalement immergées (Potamogetonales généralement) à d'autres dont seul l'appareil racinaire est en contact avec l'eau (Alismatales généralement) ; toutefois ces dernières présentent souvent au cours de leur développement une étape immergée (maturation de la graine chez les Hydrocharitacées).

EMBERGER subdivise les Hélobiées (ou Fluviales) en deux ordres : Alismatales et Potamogetonales. Mais plus que sur l'habitat, la distinction en deux ordres est basée principalement sur la fleur (disposition des carpelles et placentation), alors que du point de vue anatomique toutes ces plantes ont des caractères simultanés de Monocotylédones et de végétaux aquatiques.

Liste des familles étudiées, classées selon EMBERGER (la liste des différentes espèces sera donnée au paragraphe I - 1. 2) :

ALISMATALES

Butomacées
Hydrocharitacées
Alismatacées
Juncaginacées
(Scheuchzériacées)
(Aponogétonacées)

POTAMOGETONALES

Potamogetonacées
Ruppiacées
(Lilaeacées)
Zostéracées
(Posidoniacées)
Zannichelliacées
(Najadacées)

Remarque :

- Les familles citées entre parenthèses sont celles dont nous n'avons étudié aucun représentant.
- Pour les Hydrophytes extérieures à l'ordre (Nymphaeacées), voir la liste accompagnant celle des Fluviales au paragraphe I - 1. 2.

I - 1. 2. Origine

I - 1. 2. 1. Prélèvement et séchage

Le prélèvement de nos échantillons a été effectué en grande partie in natura, soit dans des étangs (Dombes, Massif Central, Vaccarès), soit dans des zones marécageuses (bras-morts, berges de canaux ou de rivières), soit au bord de la mer. Certaines espèces, toutefois, ont été récoltées dans les serres du Parc de la Tête d'Or (Lyon).

Les échantillons sont lavés plusieurs fois à l'eau douce en conservant préférentiellement les feuilles ; on les laisse ensuite sécher à l'ambiante, à l'ombre si possible. Dans le cas d'espèces à petites feuilles (Elodea, Potamogeton crispus, Zannichellia...), les tiges feuillées sont conservées, et dans le cas de plantes à feuilles longuement pétoliées les pétioles ont été gardés avec le limbe.

Deux essais particuliers ont été conduits concernant l'échantillonnage :

- analyse flavonique après triage et séchage séparés des trois types de feuilles de Sagittaria sagittifolia ;

- analyse de brins d'Elodée frais et desséchés.

Les résultats correspondant seront mentionnés par la suite.

I - 1. 2. 2. Origine

- Alismatales :

- Butomacées :

- Butomus umbellatus L. ; en graines ; octobre 1969 ; bords de Saône, au pont de Fontaine (rive gauche).

- Limncharis plumieri Rich. ; septembre 1969 ; en fleurs ; Serres du Parc de la Tête d'Or (plante originaire d'Amérique Equatoriale).

- Hydrocharitacées :

- Hydrocharis morsus-ranae L. ; fin octobre 1969 ; en graines ; près de Villars-les-Dombes.

- Stratiotes aloides L. ; fin octobre 1969 ; fin de végétation ; dans la Basse-Seille (Ain).

- Elodea canadensis Rich. ; octobre 1969 ; étang du Raclet (près de Saint-Nizier-le-Désert Dombes) et au Grand-Large (Rhône).

- Alismatacées :

- Alisma plantago aquatica L. ; octobre 1969 ; fin de floraison ; Parc de la Tête d'Or, étang du Raclet (Dombes), et bras morts du Rhône à Balan (Ain).

- Echinodorus muricatus Gris. ; fin septembre 1969 ; état végétatif ; Serres du Parc de la Tête d'Or.

- Sagittaria montevidensis Cham. et Schlecht ; fin septembre 1969 ; en fleurs ; Serres du Parc de la Tête d'Or ; de même dès le mois de juin.

- Sagittaria sagittifolia L. ; octobre 1969, en graines, étang du Raclet, Dombes ; juin 1970, début de végétation, étang de Tabouret, près de Charette, (Isère), où nous avons cueilli séparément les trois types de feuilles.

- Juncaginacées :

- Triglochin palustris L. ; fin septembre 1969 ; en fruits ; Parc de la Tête d'Or.

- Triglochin maritimum L. ; un seul pied provenant de la région de Roscoff.

- Potamogetonales :

- Potamogetonacées :

- Potamogeton densus L. ; début octobre 1969 ; fin de végétation ; bras morts du Rhône à Balan (Ain).

- Potamogeton natans L. ; début octobre 1969, fin de végétation à Balan ; fin octobre, en graines, Lac de Malaguet (Haute-Loire).

- Potamogeton obtusifolius M. et K. ; début octobre 1969 ; fin de floraison ; étang du Raclet.
 - Potamogeton lucens L. ; début octobre 1969 ; en graines ; étang du Raclet ; fin juin 1970 ; en fleurs ; étang de Tabouret.
 - Potamogeton crispus L. ; début juin 1970 ; fin de floraison ; Balan.
 - Potamogeton crispus L. var. serrulatus Schrad. ; fin octobre 1969 ; fin de végétation, Parc de la Tête d'Or et Grand-Large.
 - Potamogeton fluitans Roth. ; fin octobre 1969 ; en graines ; Grand-Large.
 - Potamogeton perfoliatus L. ; fin octobre 1969, fin de végétation, Grand-Large ; début Juin 1970, début de floraison, Grand-Large.
 - Potamogeton pectinatus L. ; mars 1970 ; formation des épis floraux ; Saintes-Maries-de-la-Mer.
- Ruppiacées :
- Ruppia maritima L. ; mars 1970 ; début de floraison ; Saintes-Maries-de-la-Mer.
- Zostéracées :
- Zostera angustifolia Hornem. ; en fleurs ; baie de Roscoff.
 - Zostera marina L. ; état végétatif ; baie de Roscoff.
- Zannichelliacées :
- Zannichellia palustris L. ; début octobre 1969 ; en graines ; bras morts du Rhône, près de Balan.

- Espèces étrangères de l'ordre :

Nymphaeacées :

- Cabomba caroliniana A. Gray ; juin 1970 ; en fleurs ; et décembre 1970 en fleurs ; Serres du Parc de la Tête d'Or.
- Nelumbo nucifera Gaertn. (Nelumbo speciosum Willd) ; décembre 1970 ; tout à fait en fin de végétation ; Parc de la Tête d'Or ; fin de floraison en septembre 1971.
- Nymphaea zanzibariensis Casp. ; décembre 1970 ; en fleurs ; Serres du Parc de la Tête d'Or.

I - 2 TECHNIQUES CHIMIQUES

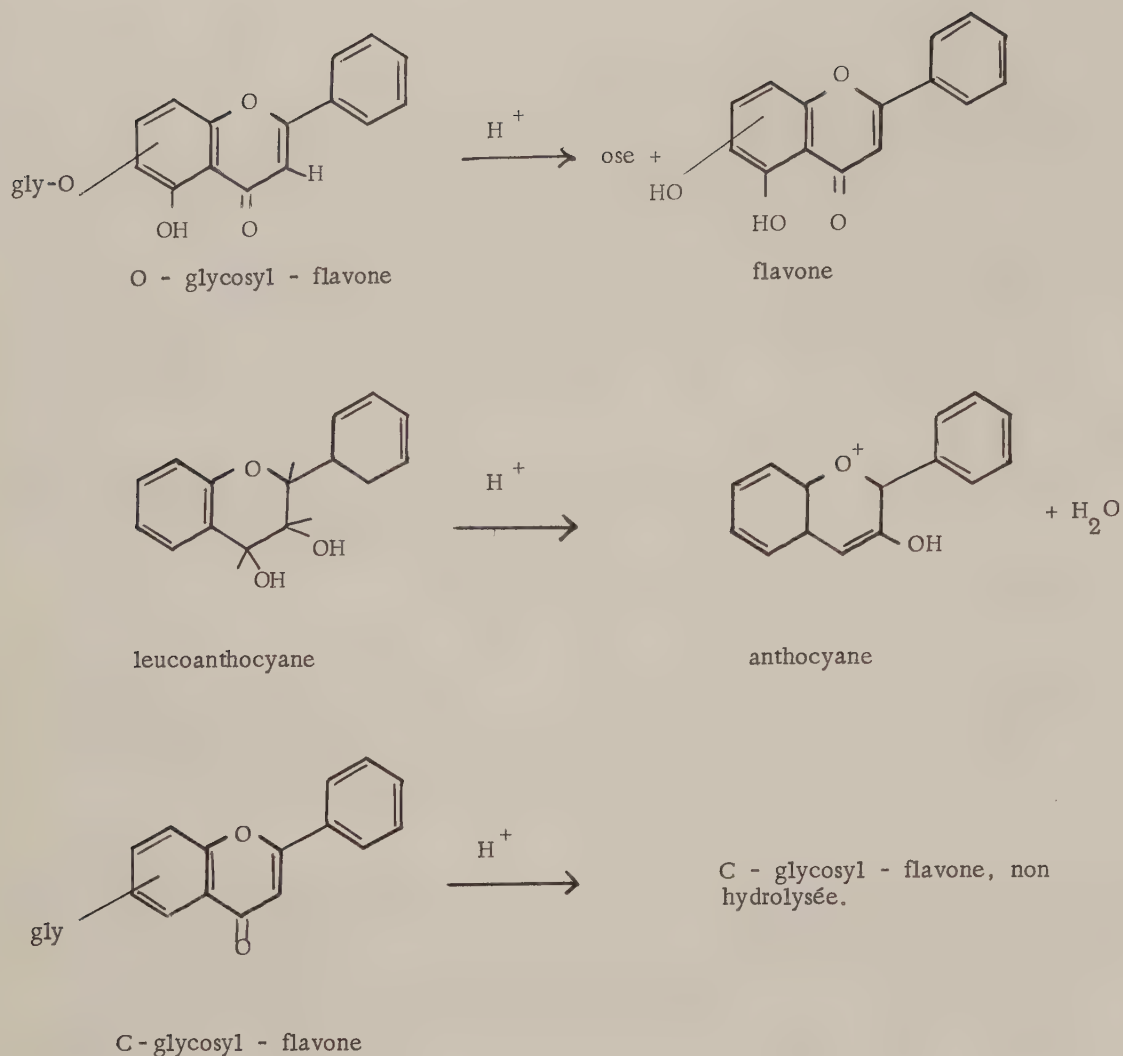
I - 2 - 1 . Techniques de l'analyse flavonique

I - 2 - 1 . 1 . Préparation

A. Extractions et hydrolyses

La technique utilisée, mise au point dans notre laboratoire (1) à partir du schéma initial de BATE-SMITH (2) est la suivante : deux ou trois grammes de matériel végétal³ sec, plus ou moins pulvérisé, sont placés dans un erlen à large col, en suspension dans 150 cm³ d'acide chlorhydrique 2N froid. Après quelques minutes de contact, l'erlen est porté durant quarante minutes au bain-marie à 100°C ; cette durée d'hydrolyse est en général suffisante pour permettre la transformation des leucoanthocyanes en anthocyanes correspondantes, et la libération des aglycones flavoniques à partir de leurs O-glycosides. Toutefois, dans ces conditions opératoires, les C-glycosides, dans lesquels les oses sont unis aux flavonoïdes par une liaison C-C, ne sont pas hydrolysés, ce qui nous a justement permis de mettre en évidence leur présence dans la majorité des espèces étudiées.

En conclusion, trois types de produits nous intéressant sont mis en cause au cours de cette hydrolyse, selon le schéma ci-après :



L'extraction des composés flavoniques, après hydrolyse, est conduite en ampoule à décanner, successivement :

- par l'éther (trois fois 150 cm³, sans séparer le matériel végétal) ; la phase étherée, contenant les aglycones et la plupart des chlorophylles est décantée, lavée à l'eau (pour éliminer l'acidité résiduelle) puis abandonnée à évaporation à l'air libre ;

- par le n-butanol (trois fois de suite, de façon à obtenir 200 cm³ de solution) ; cette phase retient les anthocyanidines éventuelles et, plus particulièrement ici, les C-glycosyl-flavones.

Remarque :

Après extraction par l'éther, le matériel végétal adhérent aux parois de l'ampoule est éliminé par lavage à l'eau avant l'extraction par le n-butanol).

Après extraction, chaque fraction est soumise à dosage selon un mode opératoire décrit ultérieurement ; puis après concentration, les extraits sont soumis à différentes chromatographies permettant de connaître la composition flavonique de chaque espèce.

B - Systèmes chromatographiques utilisés :

1° Chromatographies sur papier

Le seul support pratiquement utilisé est le papier Whatman n°1 ; le dépôt

s'effectue toujours sur une ligne située à environ 10 cm du bord de la feuille, prise dans le sens longitudinal ; la chromatographie est descendante.

Divers essais d'utilisation du papier Whatman n°3 ne nous ont pas donné de résultats satisfaisants ; ce support, à priori avantageux en raison de sa grande capacité, ne permet pas en effet une bonne séparation des composés flavoniques, même après un prélavage dans un solvant n'entraînant pas ces substances.

Pour l'isolement final de composés purs par chromatographie préparative, il est recommandé de laver les feuilles de Whatman n°1 avant leur utilisation. Pour cela, les feuilles sont successivement traitées en cuve :

- par le solvant qui servira ultérieurement aux séparations chromatographiques (c'est-à-dire, par exemple, de l'acide acétique 15 % ou 60 %) ;
- puis par de l'eau permutée ;
- enfin par l'éthanol ou le méthanol, solvants utilisés pour éluer les flavonoïdes à partir du papier.

Les feuilles sont alors séchées et directement utilisables pour le dépôt des substances à séparer.

Il est noter que les chromatographies préparatives réalisées après ce prétraitement présentent des bandes beaucoup plus nettes, sans traînées gênantes ; une autre amélioration peut aussi être apportée, dans certains cas, par l'élimination d'ions métalliques lourds présents dans le papier à l'aide d'un prélavage par une solution complexante d'EDTA.

Les différents solvants de développement utilisés pour les chromatographies sur papier sont les suivants :

- Acide acétique : 60 % ; 30 % ; 15 % ; 5 % ; 2 %.
- BAW : n-butanol-acide acétique-eau ; 4-1-5 (v/v) ; phase supérieure.
- BAW 27 % : n-butanol-acide acétique 27 % ; 1-1 (v/v) ; monophasé.
- Acétate d'éthyle-acide formique-eau ; 10-2-3 (v/v).
- Chlorure de sodium 3 %.
- Forestal : acide acétique-eau-acide chlorhydrique concentré ; 30-10-3 (v/v).
- Butanol chlorhydrique : n-butanol-acide chlorhydrique 2N ; 1-1 (v/v) ; phase supérieure.
- Solvant de Winicki (3) : méthyléthylcétone saturée d'ammoniaque 2N.

2° Chromatographies sur plaques

.....

Nous avons utilisé différents types de plaques (couche mince) :

- Plaques de gel de silice (Kieselgel G, GF₂₅₄, H ; Merck, Darmstadt).

Préparation pour 5 plaques de 20 x 20 cm : on malaxe dans un mortier 35 g. de gel avec 70 cm³ d'eau permutée, puis on étale la pâte ainsi obtenue. Les plaques, après un séchage d'une demi-heure (gel G) à trois quarts d'heure (gel H), sont activées à 110°C durant 30 mn.

Le gel G, contenant du gypse, n'est utilisable qu'en chromatographie qualitative ; le gel GF₂₅₄ est additionné d'un composé fluorescent en lumière U.V. ($\lambda = 254$ nm) ce qui permet quand on l'utilise, de mettre en évidence des composés n'absorbant pas à cette longueur d'onde.

Le gel H, sans liant, est plus approprié aux buts préparatifs.

Les plaques de silice Merck, "prêtes à l'emploi", ont également été utilisées en chromatographie analytique ; elles présentent l'avantage de donner des taches plus nettes et des Rf plus reproductibles.

Les solvants de développement des chromatographies sur plaque de silice que nous avons utilisés, sont les suivants :

- "APEM" : acétate d'éthyle-pyridine-eau-méthanol ; 80-12-10-5 (v/v).
- "5.3.1.1." : Acétate d'éthyle-méthyléthylcétone-acide formique-eau ; 5-3-1-1 (v/v)
- Benzène-pyridine-ammoniaque ; 80-20-une goutte (v/v).
- Benzène-dioxanne-acide acétique ; 90-25-4 (v/v).
- Chloroforme-méthanol-formamide ; 80-19-1 (v/v).
- Toluène-formiate d'éthyle-acide formique ; 5-4-1 (v/v).

- Plaques de cellulose (Cellulose MN 300 ou MN 300G, Macherey Nagel. Düren, Allemagne de l'Ouest).

Préparation : 15 g de poudre sont mélangés au "mixer" avec 90 cm³ d'eau permutée pendant environ une minute pour obtenir des couches plus homogènes ; avant l'emploi, il faut laisser sécher une nuit à la température ambiante.

Les solvants de développement utilisés en chromatographie sur plaques de cellulose sont les mêmes que pour la chromatographie sur papier, avec toutefois en plus le solvant : acétate d'éthyle-acide formique-eau (65-15-20, v/v).

- Plaques de polyamide (Polyamide Merck, Darmstadt).

Préparation : pour cinq grandes plaques 20 x 20 cm, il faut mélanger 15 g de poudre à 135 cm³ de méthanol-chloroforme (3-2, v/v).

Solvants de développement :

- Ethanol-eau : en proportions variables.
- Eau-éthanol-méthyléthylcétone-Acétylacétone ; 13-3-3-1 (v/v).

3° Chromatographies sur colonne

.....

Nous avons procédé à deux types de chromatographie sur colonne :

- Chromatographie sur colonne de polyamide pour les glycosyl-flavones (Ultramid B₃, B.A.S. F.) (✱).

Le polyamide est lavé dans du méthanol RP, sous agitation magnétique, durant une demi-journée ; le méthanol est alors remplacé par de l'eau ; puis le polyamide est remis en suspension, et 5 à 6 suspensions successives permettent ainsi d'éliminer les particules les plus fines qui réduisent le débit de la colonne.

Pour 25 g de matériel végétal au départ, nous avons utilisé une colonne de 70 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre.

L'échantillon à chromatographier est appliqué, au maximum de concentration, au sommet de la colonne ; l'introduction doit être très soigneuse pour éviter toute perturbation du support. L'addition d'éluant commence quand il ne reste que très peu de solution d'échantillon (1 mm).

Dans le cas des glycosides de flavonoïdes, l'élution s'effectue par un gradient eau-méthanol ; le prélèvement de fractions de 20 à 30 cm³ permet de suivre l'élution par spectrophotométrie U.V.

Remarques :

- Lorsque l'échantillon est peu soluble dans l'eau, le processus d'introduction suivant peut être adopté : l'extrait à séparer est mis en solution dans le méthanol et une petite quantité de polyamide est ajoutée, qui fixe la majeure partie des flavonoïdes ; après filtration et mise en suspension dans l'eau, ce polyamide est déposé au sommet de la colonne, tandis que le surnageant est dilué à une très faible concentration en méthanol et utilisé comme premier éluant.

- Le polyamide peut aussi être utilisé pour la séparation des aglycones flavoniques ; le solvant d'élution est alors différent : benzène, puis gradient de méthanol dans le benzène, puis apport de méthyléthylcétone (80 - 15 - 5, v/v).

- Sans faire une colonne aussi importante, il a souvent été nécessaire de "filtrer" sur polyamide un produit encore mal purifié, et ne pouvant pas, de ce fait, cristalliser ; la purification a pu alors être faite grâce à une petite colonne de polyamide montée soit dans un tube de verre effilé à une extrémité ou dans une très petite colonne.

- Chromatographie sur colonne d'acide silicique (4), pour les aglycones (acide silicique Mallinckrodt, 100 mesh).

(✱) Ce produit nous a été fourni après un traitement spécial par le Professeur H. Wagner, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität, Munich, Allemagne de l'Ouest.

La colonne est réalisée dans le chloroforme, avec un mélange en parties égales d'acide silicique et de célite (pour la rendre moins compacte).

L'échantillon est appliqué en solution dans de l'acétone (en quantité minimum), puis élué d'abord par le chloroforme, ensuite par un gradient chloroforme-acétone. L'ordre d'élution des composés semble correspondre aux substituants du noyau B : les molécules monométhoxylées en 3' et hydroxylées en 4', puis celles hydroxylées en 4' et enfin les molécules dihydroxylées en 3' et en 4'.

4° Remarque

Les systèmes chromatographiques que nous venons de décrire nous ont permis de connaître la composition flavonique des espèces étudiées ; nous les avons aussi utilisés parfois pour des recherches de sucres pouvant provenir des hydrolyses réalisées. Pour cela, nous avons procédé à deux types seulement de chromatographies :

- chromatographie sur papier, avec, comme solvant de développement du BAW 27 % ;
- chromatographie sur plaque de gel de silice, dans butanol-acétone-eau (4-5-1, v/v) comme solvant de développement.

I - 2. 1. 2. Analyse

A - Révélation :

Différents révélateurs, en relation avec la structure chimique des flavonoïdes, permettent, avec plus ou moins de succès, de caractériser en chromatographie les aglycones libres ou C-glycosylés.

- Révélation par le carbonate de sodium (solution aqueuse à 10 %) :

Les dérivés de la lutéoline apparaissent en jaune-orangé, à la lumière visible comme en U.V. (parfois en jaune-brun) ; ceux de l'apigénine se révèlent en jaune-vert, un peu orangé, alors que ceux du chrysoériol apparaissent jaune-paille en lumière naturelle et jaune-vert en U.V..

- Révélation par la benzidine bisdiazotée en milieu alcalin :

La benzidine bisdiazotée colore (*), après vaporisation de carbonate de sodium 10 %, les phénols, et plus particulièrement les flavonoïdes, différemment suivant leurs substitutions.

Dans le cas des C-glycosyl-flavones de type apigénine, acacétine, diosmétine, ou chrysoériol, ce réactif se révèle précieux puisqu'il colore les C-6-glycosides en rouge-violet, alors que les C-8-glycosides réagissent en rouge-orangé.

Ce réactif, cependant, est moins spécifique pour les dérivés de la lutéoline qui apparaissent uniformément en rouge-orangé, sans distinction des isomères.

- Révélation par le chlorure d'aluminium (1 % dans l'éthanol 95°) :

Le chlorure d'aluminium permet de distinguer, suivant leur fluorescence, les flavonols (jaune-vert) des flavones (jaune-orangé) ; mais il ne donne pas de renseignements précis sur les substitutions autre que la présence ou l'absence de l'hydroxyle en 3 (ou le blocage de l'hydroxyle en 5).

(*) La benzidine bisdiazotée se prépare extemporanément en mélangeant quelques gouttes d'une solution A diluée par 5 cm³ d'eau, à quelques gouttes d'une solution B.
Solution A : 1,8 g de chlorhydrate de benzidine, 4 cm³ d'acide chlorhydrique concentré et 96 cm³ d'eau.
Solution B : nitrite de sodium, 5 % dans l'eau.

- Révélation par le réactif de Bénédict (x) :

Ce réactif a été utilisé très régulièrement au cours de ce travail car il renseigne sur les substitutions du noyau B. Il est vaporisé sur les chromatographies papier ou sur les plaques de cellulose. Après séchage, l'observation se fait en lumière naturelle, puis en U.V. à 354 nm. ; la teinte observée semble caractéristique du noyau latéral de la flavone. Par exemple :

Pour la lutéoline, jaune-orangé dans le visible, et noir en U.V. ;
pour l'apigénine, jaune dans le visible et jaune en U.V. ;
pour le chrysoériol, jaune dans le visible et jaune-vert en U.V. ;
pour la diosmétine, jaune dans le visible et rouge-brun en U.V. ;
pour l'acacétine, jaune dans le visible et aucune fluorescence en U.V..

- Autres révélations :

Nous avons été amenée à utiliser parfois des réactifs plus spécifiques de certains composés ; leur emploi, étant moins général, sera simplement indiqué en cours d'exposé.

B - Analyse physique :

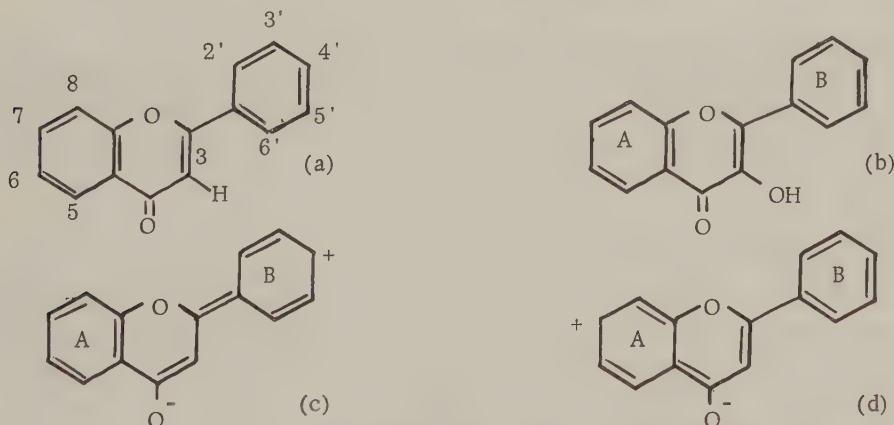
1° Spectrométrie ultra-violette (spectrophotomètre Beckman DB)

Ce sont les flavones qui prédominent dans les Fluviales ; les flavonols n'existent qu'en petite quantité dans cette famille.

Le spectre d'absorption ultra violet des flavones (a) et des flavonols (b) dans l'alcool éthylique ou dans l'alcool méthylique présente généralement deux maximums :

- le premier, situé vers 320-380 nm, caractérisant la bande I, est attribuable à la forme cinnamoyle (c) ;

- le second, vers 240-270 nm, bande II, est attribuable à la forme benzoyle (d) (6).



La bande II présente des formes et des positions différentes suivant la substitution du phényle latéral. C'est ainsi que les flavones et les flavonols substitués en 4' voient un seul maximum vers 270 nm, alors que la même bande, chez les flavonoïdes disubstitués en 3' et en 4', se traduit par deux maximums d'intensité relative et de position variables entre 250 nm et 275 nm.

La bande I semble plutôt en relation avec le noyau A ; Combier (7) a montré que l'introduction d'un hydroxyle en 8 produit un effet bathochrome de 13-14 nm par rapport à la bande I du flavonol non hydroxylé correspondant (de plus cette bande présente alors deux pics), alors qu'au contraire un hydroxyle en 6 produit un déplacement hypsochrome sur cette même bande I ($\Delta\lambda = -10$ nm). Combier note encore les déplacements dus à des groupements méthoxyles en 6 ou

(x) Réactif de Bénédict : 17,3 g de sulfate de cuivre ; 175 g de citrate de sodium et 100 g de carbonate de sodium anhydre pour un litre de solution. Après avoir fait dissoudre à chaud le citrate et le carbonate dans environ 850 cm³ d'eau, la solution de sulfate de cuivre obtenue séparément est ajoutée au mélange précédent en agitant ; le tout est ensuite complété à un litre.

8 (par exemple, avec un méthoxyle en position 6. le spectre obtenu est identique à celui du composé non substitué).

Remarque : nous avons observé régulièrement un léger effet hypsochrome sur la bande I du spectre, de l'ordre de 5 nm à 10 nm, en utilisant un alcool fortement aqueux au lieu d'un alcool anhydre.

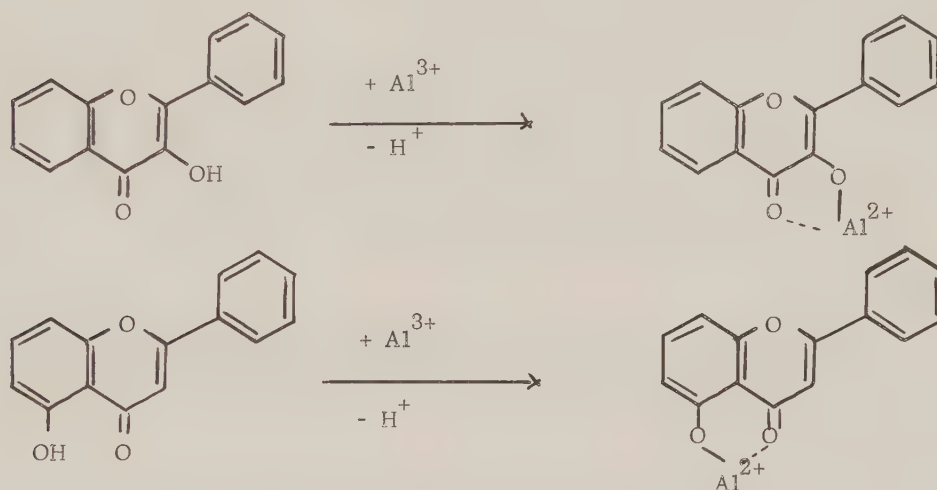
L'emploi de réactifs spécifiques permet de localiser les groupements hydroxyles libres sur la molécule :

- L'acétate de sodium anhydre ionise les hydroxyles les plus acides, c'est à dire ceux en position 3,4' et 7. L'ionisation de l'hydroxyle en 7 provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 7 nm à 20 nm ; cet effet n'est pas gêné par la présence d'hydroxyles en 3,3' et en 4' (8) qui produisent, quant à eux, des déplacements bathochromes de la bande I.

- L'acide borique (solution saturée dans le méthanol RP), en présence d'acétate de sodium, forme, avec des groupements orthodihydroxylés (en 3' et en 4'), des complexes qui provoquent un déplacement bathochrome de la bande I de 12 nm à 20 nm.

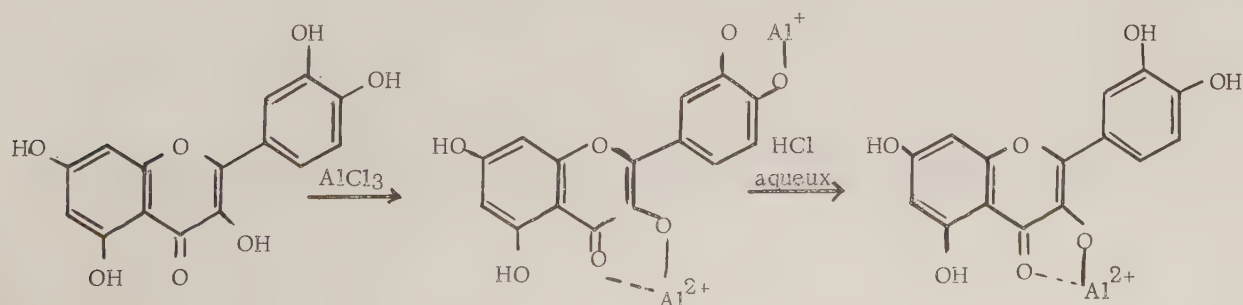
- L'éthylate de sodium (en solution éthanolique environ N/100) ionise tous les hydroxyles libres, quelle que soit leur position sur la molécule en provoquant un déplacement bathochrome des bandes I et II (de 50 à 60 nm sur la bande I). Les composés contenant à la fois un hydroxyle en 3 et en 4' ne sont pas stables dans l'éthylate et la bande I disparaît en quelques minutes (9) ; un hydroxyle en 4' provoque un déplacement plus élevé qu'un méthoxyle (apigénine, acacétine et leurs dérivés).

- Le chlorure d'aluminium (en solution méthanolique à 6 g/litre) forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en 3 ou 5, selon le schéma suivant :



Chacun des pics I et II se dédouble en deux pics ou inflexions avec un effet bathochrome différent. Dans le cas des hydroxy-5 flavones, $\Delta\lambda = +45$ nm (bande I), alors que pour les flavonols, $\Delta\lambda = +60$ nm (bande I). Lorsque les hydroxyles sont présents à la fois en 3 et en 5, le déplacement n'est pas cumulatif, l'hydroxyle en 5 n'intervient donc pas.

Notons enfin que Markham et Mabry (10) ont montré que le chlorure d'aluminium formait, dans le méthanol, un complexe avec les systèmes orthodihydroxylés (3' et 4' par exemple). Dans ce cas, la présence des deux hydroxyles est mise en évidence par comparaison des spectres obtenus d'une part avec le chlorure d'aluminium seul, et d'autre part avec du chlorure d'aluminium et de l'acide chlorhydrique ; l'addition d'acide (11), en effet, détruit le complexe formé avec le groupement ortho-dihydroxylé, et ceci s'exprime sur le spectre par un déplacement hypsochrome de la bande I de 30 à 40 nm.



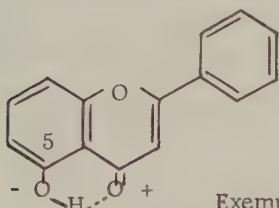
Grâce à l'utilisation des réactifs que nous venons de décrire, il est donc possible, par spectrographie U.V., de localiser les hydroxyles libres (et les groupements méthoxyles) pour les aglycones et de détecter les positions occupées par les molécules de sucres pour les glycosides flavoniques.

2° Spectrométrie infra-rouge

Les spectres I.R. ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, Infracord 137 ; nous avons opéré uniquement en pastilles de bromure de potassium.

Les spectres I.R., d'interprétation complexe, ont servi d'une part à identifier les produits étudiés par comparaison des spectres obtenus à ceux fournis par des échantillons de référence, d'autre part à utiliser certaines données plus générales de la littérature (12) (13).

Ainsi, dans une molécule de flavone, le groupement carbonyle de la benzopyrone résonne à une fréquence bien déterminée, voisine de 1650 cm^{-1} et due à la formation de liaison H entre l'hydroxyle en 5 et le groupement carbonyle. Des observations concernant le déplacement du groupement carbonyle en présence d'un hydroxyle en 7 (et sans hydroxyle en 5) ont été faites (14).



Exemple d'étude d'un spectre infra-rouge :

- A 3300 cm^{-1} , hydroxyles phénoliques libres ;
- A 1650 cm^{-1} , bande carbonyle de flavone, non déplacée s'il y a un hydroxyle en position 5 ;
- A 1600 cm^{-1} et à 1500 cm^{-1} , bandes dues aux doubles liaisons aromatiques du cycle phényle ;
- Entre 1000 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} , bandes caractéristiques dues aux hydroxyles alcooliques des sucres (liaison C-OH) et à la liaison C-sucre.

3° Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de déterminer la masse moléculaire exacte d'un flavonoïde et, par l'étude des fragments de dégradation, d'obtenir certaines données relatives aux substituants des noyaux A et B.

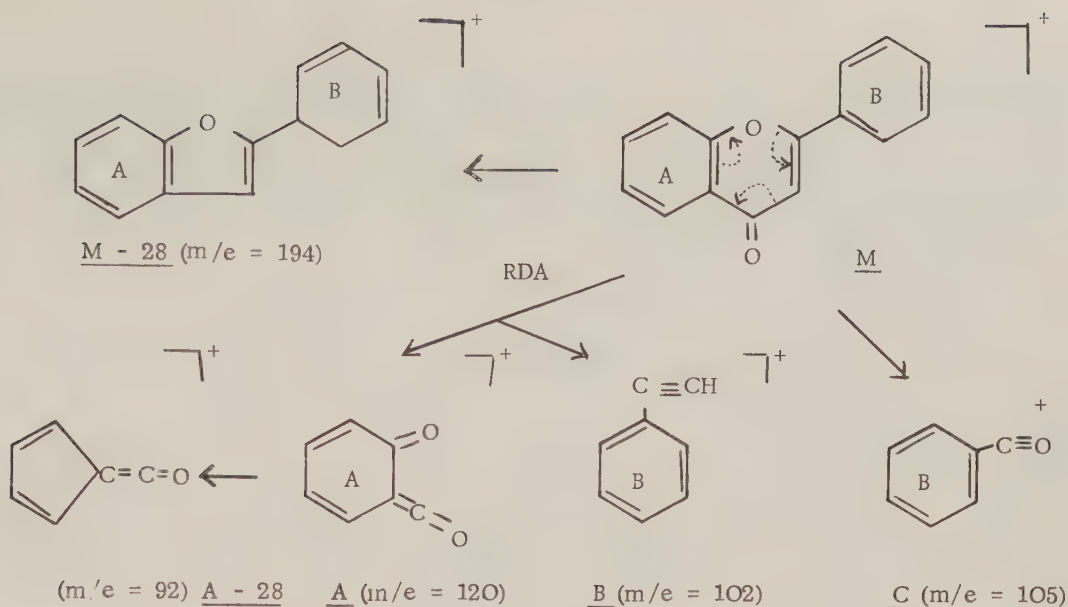
Cas des aglycones (flavones)

Le spectre de masse d'une flavone comporte peu de pics. En deçà du pic M de l'ion moléculaire, se trouve le pic M-28 correspondant à la perte d'oxyde de carbone (en position 4).

Les noyaux A et B de la flavone (B correspondant aux phényle latéral) donnent naissance, d'après Audier (15), à deux fragments "A" et "B" par coupure. Les pics "A" et "B" sont interprétables par une rupture rétro-Diels-Alder (RDA) dans le cycle, et caractérisent une structure de flavone. Ces ions "A" et "B" peuvent aussi se refragmenter ; ainsi l'ion A donne, par exemple, l'ion A-28 après perte d'oxyde de carbone.

De plus, les substituants déplacent les pics en fonction de leur masse, ce qui permet de préciser leur nature. Dans le cas d'une flavone non substituée ou hydroxylée sur le noyau B, le pic "A" est beaucoup plus grand que le pic "B" ; c'est l'inverse qui se passe quand il y a un groupement méthoxyle sur le noyau B.

Le processus de fragmentation d'une flavone, proposé par Audier, est le suivant :



Quelques résultats numériques obtenus :

Les pics "B" (provenant de la fragmentation du noyau B) et les pics "A" (dûs au noyau A) fournissent donc des renseignements sur le nombre et la nature des substituants.

Fragment "B"

m/e = 102	noyau B non substitué
m/e = 118	noyau B monohydroxylé
m/e = 132	noyau B monométhoxylé
m/e = 134	noyau B dihydroxylé
m/e = 162	noyau B diméthoxylé
m/e = 148	noyau B monohydroxylé et monométhoxylé

Fragment "A"

m/e = 120	noyau A non substitué
m/e = 136	noyau A monohydroxylé
m/e = 152	noyau A dihydroxylé

En résumé, toujours d'après les travaux de Audier, nous pouvons donner les intensités comparées des pics "A" et "B" suivant le nombre et la nature des substitutions du noyau B :

noyau B non substitué	A > B	(A + 1) = D très faible
noyau B monohydroxylé	A > B	D fort
noyau B monométhoxylé	B > A	D très faible
noyau B diméthoxylé	B > A	D fort

Cas des glycosyl-flavones

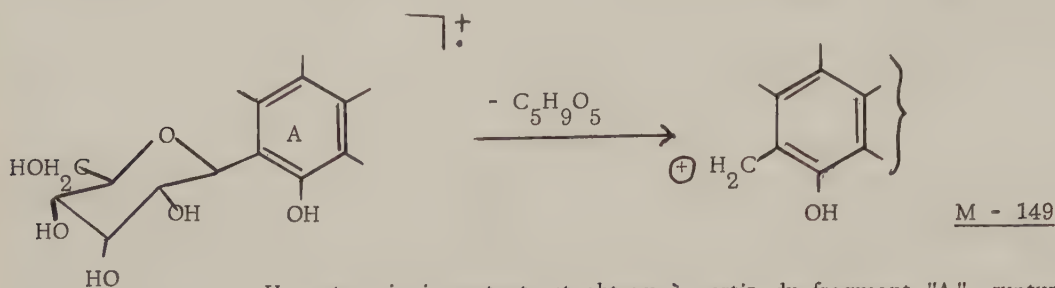
Les spectres de masse ont été effectués en partie au Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon à l'aide d'un appareil AEI MS 902, en partie au service de spectrométrie de masse de l'Ecole de Chimie de Lyon, à l'aide d'un appareil CH5 Varian MAT.

Lorsque le sucre est lié à la flavone par une liaison O-glycosidique, celle-ci est rompue en éliminant le sucre ; le spectre de masse obtenu est donc celui de l'aglycone, avec un nombre de pics relativement peu important.

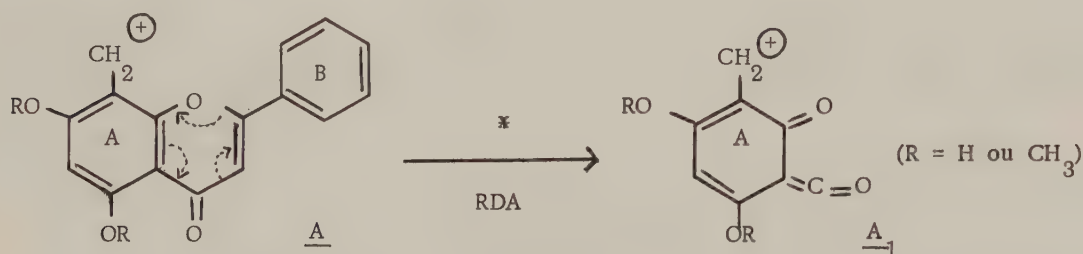
Il n'en est pas de même avec les C-glucosyl-flavones ; les spectres obtenus dans ce cas ont été étudiés par Prox (16). La fragmentation atteint d'abord la partie sucre, en éliminant une ou plusieurs molécules d'eau entre le sucre et l'hydroxyle phénolique en ortho du sucre

(si celui-ci est libre), puis ensuite à l'intérieur même du sucre ; il est aussi possible qu'en ortho du sucre il se trouve par exemple un groupement méthoxyle (cas envisagé aussi par Prox).

Le pic M - 149 ($M = C_5H_9O_5$) est un pic très caractéristique de cette structure C-glycosylée : il correspond au noyau A de l'aglycone auquel reste soudé le C-1 du sucre après coupure du cycle pyranose avec transfert d'un atome d'hydrogène du sucre.



Un autre pic important est obtenu à partir du fragment "A", rupture retro-Diels-Alder (comme dans le cas de la flavone seule) :

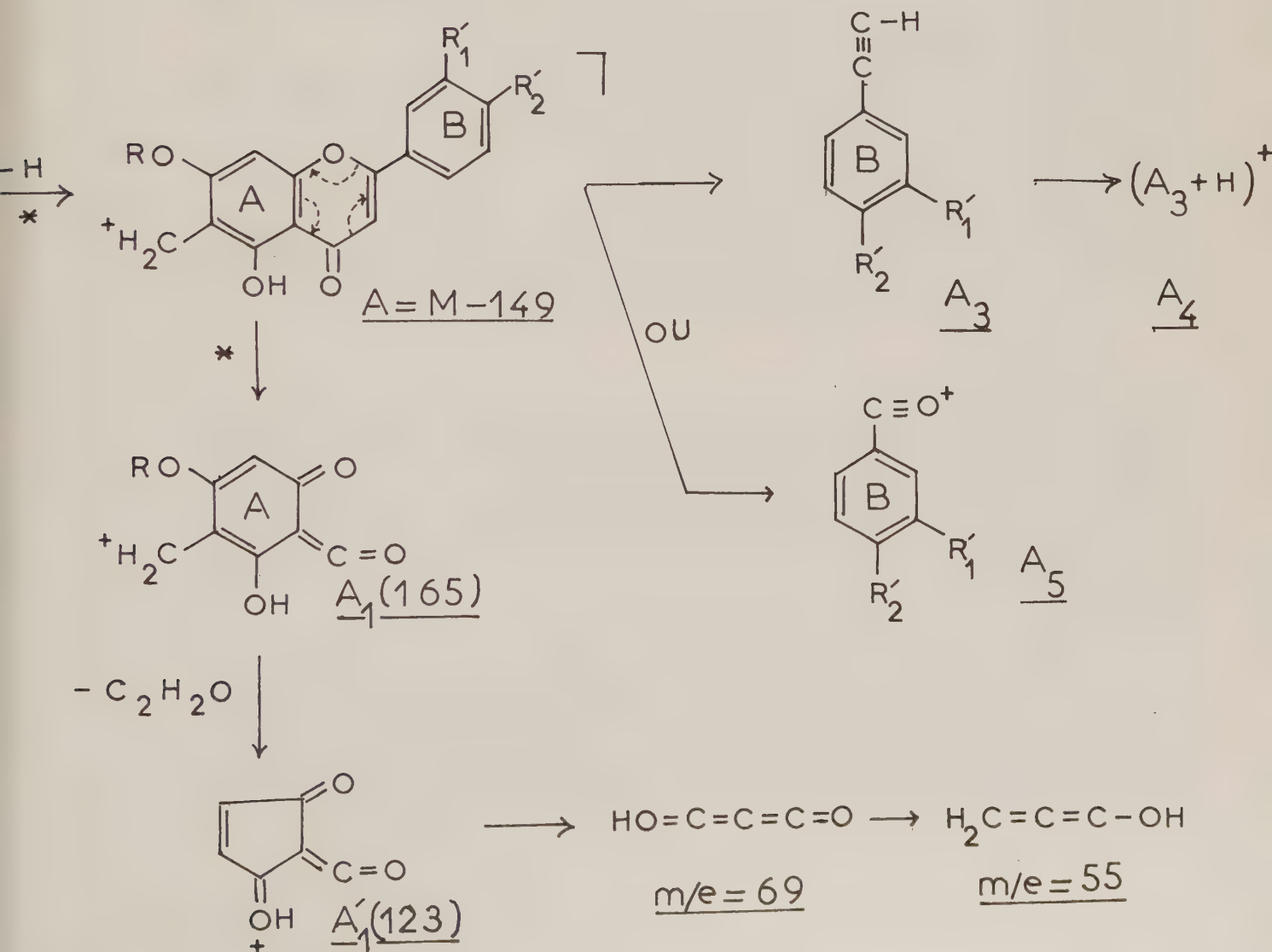
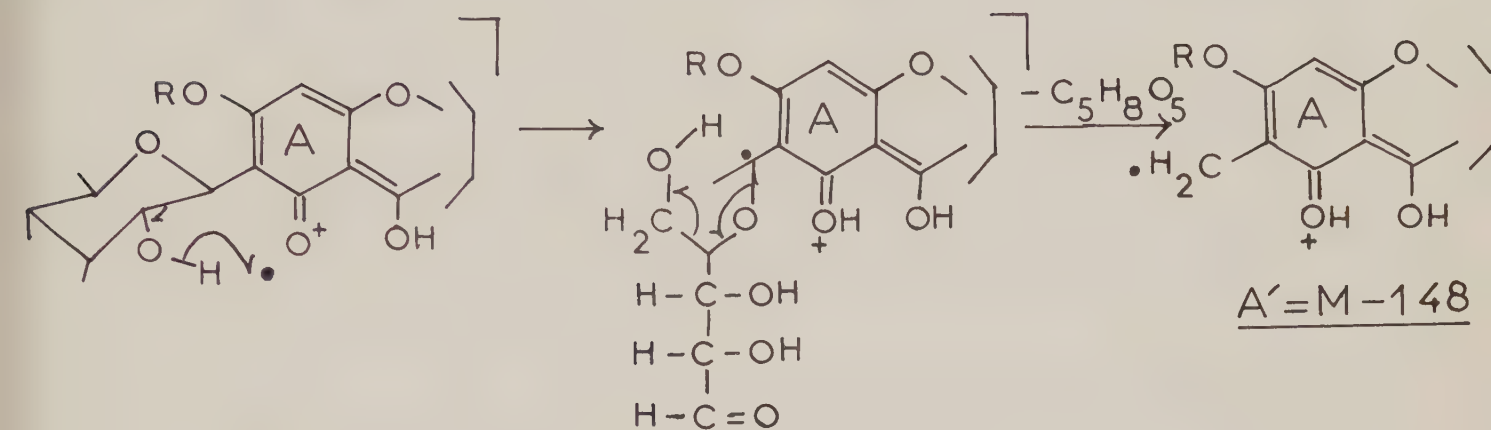


Nous reproduisons ci-contre un schéma de fragmentation de C-glucosyl-flavone, selon Prox, avec les principaux radicaux obtenus.

Notons que :

- les ions A et A' montrent d'après Prox, que le sucre est fixé par un carbone sur l'aglycone. (dans ce schéma, R = H ou CH₃).

- après élimination du sucre, c'est à dire de C₅H₈O₅ en fait, l'ion A va donner la fragmentation de l'aglycone à partir des 2 noyaux A et B. Donc A₃, A₄ et A₅ correspondent au noyau latéral B ; le processus rappelle celui d'Audier dans le cas des aglycones flavoniques.



Nous indiquons ci-dessous les différentes masses trouvées pour les C-glucosides dérivés de la lutéoline, du chrysoériol et de l'apigénine suivant le nombre de groupements hydroxyles fixés à la flavone :

	C-glu. -lutéoline	C-glu. -chrysoériol	C-glu. -apigénine
M	448	462	432
A' = M-148	300	314	284
A = M-149	299	313	283
A ₁	165	165	165
A ₁ ¹	123	123	123
A ₃ ¹ (pic B d'Audier)	134	148	118
A ₄ = A ₃ + 1	135	149	119
A ₅	137	151	121
69	69	69	69
55	55	55	55

En conclusion du point de vue structural, un spectre de masse renseigne :

- sur les substituants du noyau latéral en donnant les masses des fragments A, A₁, mais surtout A₃, A₄ et A₅.
 - sur la présence ou l'absence d'un groupement hydroxyle phénolique en ortho du sucre.
- Dans ce cas, Prox indique la nature des ions formés en décrivant les fragments C, D, D₁, C₁...

Remarques

1 - Des glycosylflavones dont le sucre est différent du glucose ont été trouvées dans la nature ; dans le cas où le sucre est un pentose, la spectrométrie de masse renseigne sur la masse moléculaire globale.

2 - Prox signale aussi qu'une distinction peut être faite par spectrométrie de masse entre deux isomères par comparaison des différences d'intensité des pics "A'" des deux spectres (A' = A + 1) : l'ion A' de la C-glucosyl-6-flavone serait plus intense que celui de la C-glucosyl-8-flavone isomère. Notons que cela n'est pas toujours net dans les cas que nous avons étudiés ci-dessous.

4° Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

En général les spectres de R.M.N. de glycosylflavonoïdes sont effectués sur des dérivés des hydroxyles (phénoliques), leur blocage ayant l'avantage de solubiliser les produits et d'éviter les réactions d'échange de protons phénoliques avec le solvant.

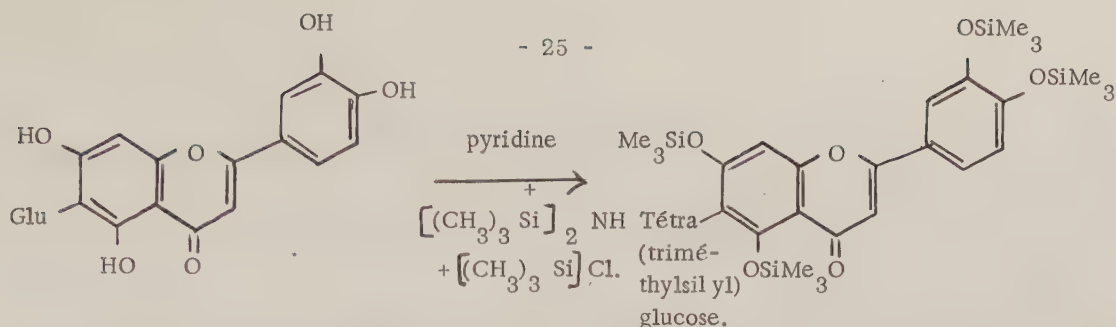
De nombreux spectres utilisent les dérivés acétylés ou triméthylsilylés.

Dérivés acétylés

Le déplacement chimique des protons acétoxydes de sucres chez les glycoflavonoïdes permet de distinguer O- et C-glycosides, l'acétoxyde en 2' chez ces derniers étant blindé par effet diamagnétique du phényle voisin ; ce même effet est reconnu par Horowitz (17) et par Hillis (18) comme élément distinctif entre les C-6 et C-8 glycosylflavones, l'acétoxyde en 2' des C-6 glycosides subissant un effet de blindage plus important que celui des C-8. D'autres renseignements plus complexes ont été tirés par Hillis de spectres de R.M.N. d'acétyl C-glycosyl-flavones obtenus à différentes températures (19).

Dérivés silylés. Avantages

. Préparation - Le flavonoïde (environ 30 mg si possible, ou au moins 10 mg) est dissous dans 3 ml de pyridine RP (Prolabo) à froid, puis traité par 0,5 ml d'hexaméthylidisilazane (Alfa Inorganic Inc. 8 Congress Street, Bererley, Massachusett ; ref. Si - 162), et enfin par 0,5 ml de triméthylchlorosilane (Prolabo). L'excès de solvant et de réactif est éliminé immédiatement par évaporation sous vide, et le résidu sec repris par CCl₄. Le type de produit obtenu, par exemple, avec un des OH phénoliques est le suivant :



. Il est possible de récupérer le flavonoïde de départ, après triméthylsilylation, par traitement par le méthanol à 20 % (en présence de traces d'acide acétique) pendant une nuit : à la suite de cela, soit le flavonoïde recristallise, soit il faut évaporer le solvant pour en choisir un autre plus apte à la cristallisation.

. Interprétation - En ce qui concerne l'interprétation d'un spectre de R.M.N. de flavonoïde triméthylsilylé, les signaux des protons sont pratiquement tous localisés entre 0 et 9 ppm (en valeur 10^{-6}), et localisés dans des groupes bien séparés. Autrement dit, en partant de $\delta = 0$ (ce qui correspond à l'origine due au tétraméthylsilane) :

- de 0,5 à $\sim 1,7$ ppm, résonance des protons aliphatiques (CH_3) ;
- de 3,5 à ~ 5 ppm, résonance des protons de sucre (CHOH) ;
- de ~ 6 à ~ 8 ppm, résonance des protons aromatiques de l'aglycone.

Structure de l'aglycone :

- Noyau A. Les protons en position 6 et 8 résonnent entre 6 et 8 ppm (en valeur δ) selon les substituants en 5 et 7. Le signal du proton en 6 (aux environs de 6,2 ppm) se situe toujours à un champ plus élevé que le proton en 8.

Un proton de flavone, en position 3, résonne vers 6,3 ppm et donne un singulet.

Enfin si l'hydroxyle en 5 est remplacé par un hydrogène, le carbonyle en 4, anisotropiquement diamagnétique, fait résonner ce proton vers des champs plus faibles, près de 8,0 ppm.

- Noyau B. Les protons de ce noyau résonnent entre 6,7 et 8,2 ppm ; ceux en 3' et 5' sont situés à un champ plus élevé que ceux en 2' et 6' (signaux entre 7,2 et 7,9 ppm).

Le proton en 5' d'une dihydroxy-3', 4' flavone donne un doublet centré entre 6,7 et 7,1 ppm avec comme constante de couplage $J = 8,5$ cps. Dans le cas d'un couplage méta, on a $J = 2,5$ cps.

Notons enfin la présence de méthoxyles dans la molécule se traduit par un pic autour de 3,8 ppm.

Cas d'un glucosylflavonoïde :

La R.M.N. donne aussi des renseignements sur les sucres liés à l'aglycone. Ainsi le proton osidique H_1 résonne différemment des autres protons de la molécule, à des valeurs qui dépendent de la nature du sucre et de la position de la liaison.

Chez la plupart des glucosides naturels connus, le sucre présente une liaison, les protons H_1 et H_2 étant tous deux en position trans, axiale-axiale. Dans le spectre de R.M.N., ce fait se traduit par la présence d'un doublet de couplage $J = 8$ à 10 cps (~ 5 ppm), plus ou moins bien résolu suivant la nature et la position de la liaison osidique.

En effet, chez les O-glucosyl-7 flavones, par exemple, où l'empêchement de rotation est limité, ce doublet est souvent remplacé par un massif, tandis que chez les C-glucosyl-6 ou 8 flavones, la rotation du sucre est réduite et ce doublet est beaucoup mieux marqué.

2. 2. Mode opératoire. "Analyse de routine"

Après l'hydrolyse chlorhydrique de 40 mn au bain-marie bouillant, et les extractions successives à l'éther et au n-butanol (voir p. 5), deux séries de dosages sont réalisées pour chaque espèce végétale, ce qui permet un travail comparatif d'une plante à l'autre.

I - 2. 2. 1. Fraction aglycones (phase éther)

Le résidu d'extraction est dissous dans l'éthanol à 96° et la solution obtenue est introduite dans une fiole jaugée de 10 cm³.

Le dosage spectrophotométrique se fait par différence entre :

- la solution alcoolique ci-dessus, amenée à une dilution convenable avec de l'éthanol à 96°, et placée dans la cuve de référence ;
- et la solution initiale, amenée à la même dilution que la première avec une solution alcoolique de chlorure d'aluminium (6g/litre) et placée dans la cuve de mesure.

Au bout de 10 mn, le spectre est enregistré entre 340 et 450 nm ; la lecture spectrophotométrique est effectuée vers 430 nm (présence de flavonols) ou vers 390-400 nm (présence de flavones).

La hauteur du pic différentiel est proportionnelle à la teneur en flavonoïdes. Le calcul de la teneur en aglycones, exprimée comme lutéoline, se fait à l'aide de la formule suivante :

$$T = \frac{(D. O.)}{\epsilon} \cdot M \cdot V' \cdot \frac{1}{P}, \text{ où } M = 286 \text{ et } \epsilon = 2,034 \cdot 10^4 \text{ (20)}$$

$$T = \frac{(D. O.)}{\epsilon} \cdot 286 \cdot \frac{V \cdot d}{P}$$

$$T = 1,4 \cdot 10^{-2} \cdot (D. O.) \cdot \frac{V \cdot d}{P}, \text{ en mg/g ou en \%}$$

avec ϵ = coefficient d'extinction molaire de la lutéoline,

M = masse moléculaire de la lutéoline,

V' = V.d = volume réel de l'extrait multiplié par la dilution.

I - 2. 2. 2. Fraction (leuco-) anthocyanes (phase butanol)

Le rendement de la transformation L.A $\rightarrow$ anthocyanes étant admis sensiblement constant ; le dosage spectrophotométrique des anthocyanes obtenues se fait en mesurant la densité optique vers 550 nm. L'extrait butanolique (habituellement 200 ml) est amené à une dilution convenable avec du n-butanol.

La teneur en leucoanthocyanes, exprimée en leucocyanidine, peut être calculée avec la formule suivante, où est introduit un facteur de correction égal à 6 (dû au rendement de la transformation leucoanthocyane $\rightarrow$ anthocyane qui est de l'ordre de 17 %) :

$$T = 6 \cdot \frac{D. O.}{\epsilon} \cdot M \cdot \frac{V \cdot d}{P} ;$$

ou M = 306 = masse molaire de la leucocyanidine,

ϵ = 34700 = coefficient d'extinction molaire de la leucocyanidine.

d'où $T = 5,2 \cdot 10^{-2} \cdot (D. O.) \cdot \frac{V \cdot d}{P}, \text{ en mg/g ou \%}$.

I - 2. 2. 3. Fraction C-glucosylflavones (phase butanol)

L'extrait butanolique n'est pas toujours coloré en rouge, aucune bande d'absorption n'apparaît vers 550 nm, c'est à dire qu'il n'y a pas d'anthocyanes.

Par contre, l'enregistrement du spectre dans l'ultra-violet peut présenter une bande d'absorption dans la région 330-360 nm. Ceci indique donc la présence d'un type particulier de flavonoïdes : les C-glucosylflavones, qu'il est logique de déceler ici puisque 40 nm d'hydrolyse ne suffisent pas à séparer le sucre de l'aglycone. En effet, le spectre d'absorption UV de l'orientine (C-glucosyl-8-lutéoline) est identique à celui de l'aglycone correspondant ; la bande d'absorption se situe vers 350 nm et le coefficient d'extinction molaire de l'orientine est $\epsilon = 1,885 \cdot 10^4$ (20).

Connaissant la masse molaire de l'orientine ($C_{21}H_{20}O_{11} = 448$), la teneur en C-glucosylflavones peut être calculée en utilisant une formule analogue aux deux précédentes :

$$T = \frac{(D. O.)}{\epsilon} \cdot M \cdot \frac{V \cdot d}{P} = 2,5 \cdot 10^{-2} \cdot (D. O.) \cdot \frac{V \cdot d}{P}, \text{ en mg/g ou \%}$$

I - 2. 2. 4. Systèmes chromatographiques consécutifs aux dosages de chaque
.....
espèce végétale
.....

Nous ne signalons ici que les chromatographies analytiques utilisées de façon régulière.

- Phase étherée :

- . Chromatographie sur plaque de gel dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique ;
- . Chromatographie sur papier dans l'acide acétique 60 % ; (en présence de témoins).

- Phase butanol (Anthocyanes) :

- . Chromatographie bidimensionnelle dans le Forestal puis le Butanol chlorhydrique.

- Phase butanol (C-glucosylflavones) :

- . Chromatographie bidimensionnelle dans BAW (415 ou 27 %) puis l'acide acétique 15 % ;
- . Chromatographie sur plaque de gel dans APEM ;
- . Chromatographie sur papier dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau.

C'est à la suite de ces premiers résultats généraux qu'ont été réalisées différentes chromatographies préparatives, afin d'isoler et d'identifier un maximum de composés majeurs.

CHAPITRE II

Les Flavonoïdes de POTAMOGETON NATANS

II - 1. SCHEMAS D'ISOLEMENT

II - 1. 1. Introduction

Les flavonoïdes des feuilles de Potamogeton natans L. ont été étudiés, non seulement après une hydrolyse acide par la méthode habituelle, mais aussi à l'état naturel après extraction par solvants.

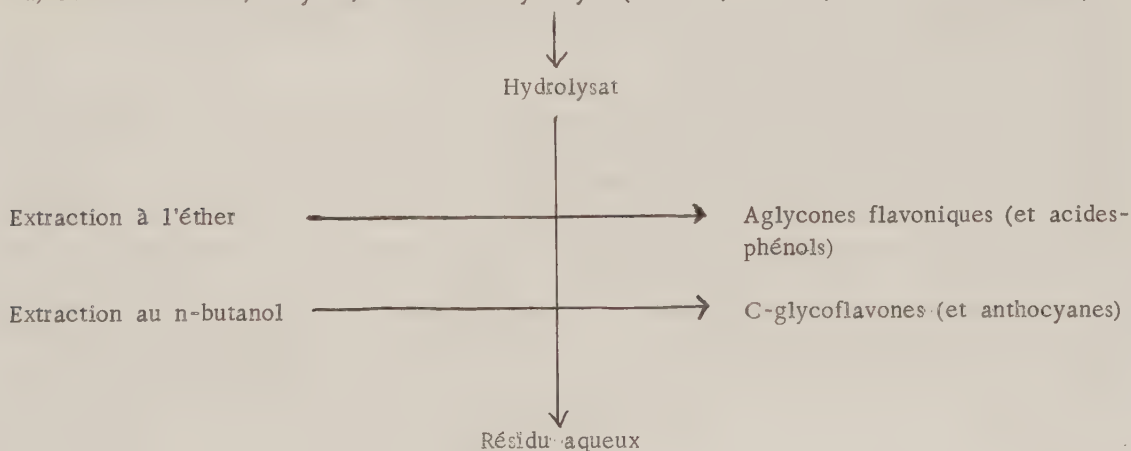
Par ces deux processus que nous nous proposons de décrire, nous avons obtenu des résultats complémentaires qui nous ont permis d'établir la structure de la plus grande majorité des composés flavoniques présents. Naturellement, chacune des deux méthodes a présenté, selon la molécule envisagée, des avantages et des inconvénients ; par exemple :

- dans l'éventualité de la présence de O-glycosides, l'hydrolyse acide clarifie le problème puisqu'elle met en évidence les seuls aglycones ; mais la présence de ces derniers après hydrolyse n'exclue pas leur existence à l'état libre dans la plante, bien que cette hypothèse soit peu probable pour des tissus foliaires ;
- de plus, l'hydrolyse permet de distinguer les O- des C-glycosylflavones ; mais dans le cas de ces dernières, le traitement acide provoquant en outre leur isomérisation, il est nécessaire d'adopter une autre méthode pour préciser sans doute possible leur forme naturelle.

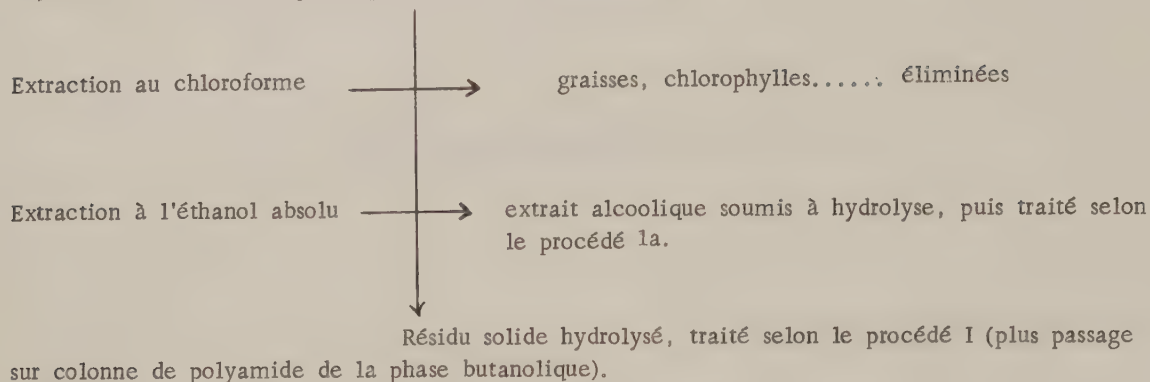
Nous pouvons schématiser de la façon suivante les deux procédés utilisés successivement :

Procédé I :
.....

1a) Feuilles séchées, broyées, soumises à hydrolyse (HCl 2N, 40 mn, bain-marie bouillant).

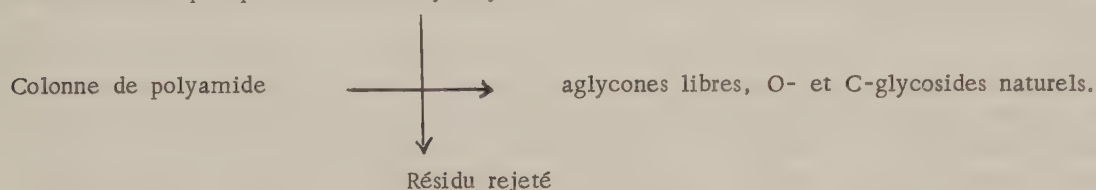


1b) Feuilles séchées, broyées, placées dans un "Soxhlet".



Procédé II :
.....

Résidu solide repris par l'eau, non hydrolysé.



Dans notre cas particulier c'est le procédé II qui s'est révélé le plus efficace.

II - 1. 2. Hydrolyse acide

Une première opération sur 3 g de feuilles sèches a servi à doser globalement les fractions étherée et butanolique, ainsi qu'à mettre en évidence les différents flavonoïdes (aglycones et C-glycosides) par quelques chromatographies qualitatives.

Pour une étude plus complète, nous avons réalisé plusieurs hydrolyses successives selon deux variantes :

- directement à partir de feuilles séchées, non "délipidées", avec de plus grandes quantités de matériel (10 ou 30 g respectivement, dans 600 ou 1000 cm³ d'acide chlorhydrique 2N) ; mais les séparations chromatographiques ultérieures étaient alors perturbées par une grande abondance de chlorophylles et autres composés lipophiles ;

- ou bien, (et c'est ce qui nous a fourni les meilleurs résultats quantitatifs) hydrolyse de feuilles, "dégraissées" par le chloroforme puis l'éthanol absolu dans un appareil de Soxhlet ; dans ce dernier cas, nous avons analysé, après traitement de fractions aliquotes, le contenu des extraits chloroformique et éthanolique et celui du végétal résiduel. Sur les chromatogrammes bidimensionnels, se retrouvait sensiblement la même répartition en C-glycoflavones et seule variait la teneur des 3 extraits différents. L'extrait chloroformique étant à rejeter à cause de la trop grande abondance en produits verts, plus ou moins gras, nous avons finalement travaillé sur le végétal résiduel qui s'est révélé contenir la même gamme de composés flavoniques que le Potamot "global" ; il a été également vérifié que la phase chlorhydrique épuisée par solvants (éther et butanol) après hydrolyse, ne contenait plus de flavonoïdes sous quelque forme que ce soit.

Remarque :

Les expériences décrites ci-après sont relatives au traitement de 30 g de matériel végétal.

a) Etude de la phase étherée

Cette dernière, évaporée à sec à l'air ambiant est reprise par 100 cm³ d'éthanol 95°.

-- Une petite partie est déposée à fins préparatives sur papier Whatman I (4 feuilles) et chromatographiée dans l'acide acétique à 60%. Deux bandes de fluorescence brun-violet en lumière U.V. (350 nm) sont obtenues :

. Bande I $R_f = 0,51$.

. Bande II $R_f = 0,60$.

L'élution des 2 composés correspondants par l'éthanol a permis d'en obtenir les spectres ultraviolets et de les rechromatographier, dans un but analytique, dans divers solvants en présence de témoins.

-- Le reste de la solution éthanolique est évaporé à sec et repris par un peu de chloroforme. La solution vert foncé obtenue est introduite au sommet d'une colonne d'acide silicique.

L'élution commence avec le chloroforme : la première fraction (vert-foncé) contient les chlorophylles, et le solvant n'est modifié que lorsque l'éluat est pratiquement incolore.

La 2ème fraction (jaune) est obtenue avec de l'acétone à 5% dans le chloroforme ; sur plaque de gel de silice, une chromatographie de contrôle ne révèle encore que des chlorophylles...

Avec la fraction 5, obtenue par l'acétone à 10% dans le chloroforme, apparaissent des flavonoïdes, brun-violet sur plaque de gel de silice ($R_f = 0,74$).

La fraction 6, (20% d'acétone dans le chloroforme), contient le flavonoïde de la bande II, de $R_f = 0,60$ sur papier Whatman I dans l'acide acétique 60%. Evaporée à sec et reprise par le méthanol, elle permettra d'identifier la substance correspondante grâce à son spectre I.R.

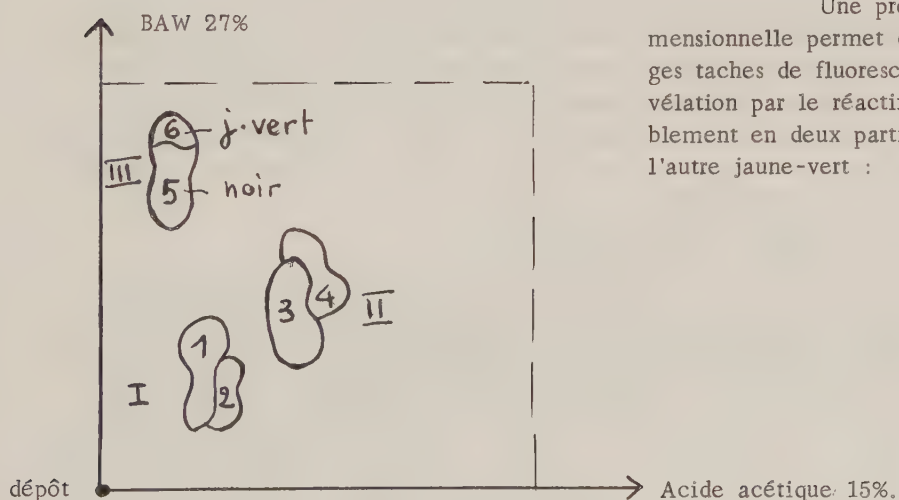
La fraction 7 (50% d'acétone dans le chloroforme) et les fractions suivantes, obtenues en augmentant la concentration d'acétone jusqu'à 100%, n'ont pas permis la séparation à l'état pur du second flavonoïde (bande majeure de $R_f = 0,50$ sur papier Whatman I dans l'acide acétique 60 %).

Aussi, pour tenter d'obtenir un meilleur isolement de ce dernier, avons-nous repris les éluats des bandes chromatographiques (Acide acétique 60%) et les avons-nous soumises à un traitement que nous décrirons en II - 2. 1.

b) Etude de la phase butanolique

Celle-ci est évaporée à sec sous vide vers 55°C et reprise par de l'éthanol à 95°.

Une première chromatographie bidimensionnelle permet de mettre en évidence 3 larges taches de fluorescence brun-violet, dont la révélation par le réactif de Bénédict montre le déroulement en deux parties, l'une de fluorescence noire, l'autre jaune-vert :



		BAW 27%	Ac. Acét. 15%	Révélation
I	{ 1	Rf = 0,36	Rf = 0,24	noire en U. V. au Bénédict.
	{ 2	0,40	0,24	jaune-vert " " "
II	{ 3	0,45	0,41	noire " " "
	{ 4	0,49	0,46	jaune-vert " " "
III	{ 5	0,65	0,34	noire " " "
	{ 6	0,68	0,34	jaune-vert " " "

Devant de tels résultats, il s'avérait donc impossible de séparer ces 6 constituants par une seule série de chromatographies préparatives, et une technique plus élaborée devait donc être utilisée.

c) Séparations chromatographiques sur papier

L'extrait butanolique concentré est déposé sur feuilles de papier Whatman II, et les chromatogrammes développés par l'acide acétique 15%, ce qui fournit deux larges taches brun-violet, de Rf 0,3 et 0,5. Après découpage, et élution par du méthanol à 50%, les substances concentrées sont déposées sur papier Whatman I et chromatographiées dans le BAW.

Nous avons ainsi obtenu 5 des 6 bandes attendues : bandes 1 et 2 (tache I), bandes 3 et 4 (tache II). et une dernière bande composée des bandes 5 et 6 en mélange (tache III).

Les 4 premières bandes ont été éluées par du méthanol à 50% ; aucun de ces composés n'ayant pu être directement cristallisé, nous avons dû achever leur purification par une filtration sur de petites colonnes de polyamide avec un gradient méthanol-eau. Chaque substance, éluee par le méthanol à 50%, a pu être alors cristallisée dans ce même solvant, les cristaux obtenus étant en quantité suffisante pour permettre l'obtention des spectres U.V., I.R. et de masse, d'où l'identification à des C-glycosyl-flavones de référence.

La tache III (bandes 5 et 6 en mélange) n'ayant pu être résolue au cours de ces séparations, a été rechromatographiée dans l'acide acétique 60%, ce qui nous a permis d'obtenir les composés 5 (le plus important) et 6 à l'état chromatographiquement pur. Après cristallisation, les spectres U.V., I.R. et de masse de ces deux substances ont été enregistrés ; l'identification de ces produits aux substances de référence en notre possession n'ayant pu être conduite, une étude structurale plus approfondie s'imposait, et par là réclamait une plus grande quantité de produit. Nous avons donc dû envisager une méthode de séparation portant sur une plus grande quantité de matériel végétal.

d) Séparation sur colonne de polyamide

Après hydrolyse dans 2 litres d'acide chlorhydrique 2N, et extraction à l'éther de 50 g de feuilles de Potamogeton dégraissées, les 1250 cm³ d'extrait butanolique brun obtenus sont évaporés sous vide vers 55°C, fournissant 4 g de résidu sec. Ces 4 g repris dans le minimum de méthanol, et additionnés d'un peu d'eau sont fixés sur un peu de polyamide. La colonne utilisée (80 x 2 cm) est remplie de polyamide en suspension dans l'eau ; au sommet est ajouté le mélange polyamide-flavonoïde.

Au fur et à mesure de l'élution, fractionnée tous les 15 cm³ par un collecteur, nous avons enregistré le spectre U.V. de 5 tubes en 5 tubes, et analysé l'éluat par chromatographie.

Nous avons successivement introduit en sommet de colonne :

- 250 cm³ d'eau permutée ;
- 230 cm³ de méthanol 20% ;
- 1150 cm³ de méthanol 50% ;

C'est seulement à partir du tube n° 55 (800 cm³ environ) que nous avons obtenu un spectre U.V. de type "flavone" (nécessitant la dilution de l'éluat). Après comparaisons spectrales et chromatographiques, nous avons pu rassembler le contenu des tubes 51 à 68 pour constituer la fraction a, ne renfermant qu'un seul flavonoïde.

La fraction b, formée par le contenu des tubes 69 à 75 inclus, est apparue comme un mélange de 2 C-glycosylflavones à même aglycone.

La fraction c résulte de la réunion des tubes 76 à 90, et se présente chromatographiquement comme un mélange.

La fraction d, formée du contenu des tubes 91 à 110, est un mélange de 2 C-glycosylflavones à même aglycone, différent de celui de la fraction b.

- 1350 cm³ de méthanol 60% ;

A partir du tube 111 (1600 cm³ environ), les spectres obtenus sont mal définis et aucune tache brun-violet n'apparaît à l'examen des chromatogrammes en U.V. ; ceci constitue la fraction e que nous avons négligée.

Le contenu des tubes 140 à 145 donne une seule tache de flavonoïde de Rf relativement élevé dans le BAW ; elle constitue la fraction f.

Puis dans les tubes 145-150 (fraction g), nous retrouvons un mélange de 2 constituants dont l'un semble correspondre au flavonoïde de la fraction f, l'autre ayant un Rf légèrement inférieur dans le BAW.

Enfin, les tubes 151-170 (fraction h) et 171-190 (fraction i) ne contiennent que la tache flavonique de Rf inférieur dans le BAW 27% ; la fraction i a dû être rechromatographiée pour obtenir le produit correspondant cristallisé.

- 300 cm³ de méthanol 70% ;
- 500 cm³ de méthanol 80% ;

A partir du tube 191, les spectres enregistrés jusqu'au tube 215 ne correspondent plus à des flavonoïdes purs (DO vers 260 nm beaucoup plus forte que celle vers 330 nm). Peut-être reste-il encore un peu de flavonoïdes, mais rien n'apparaît en chromatographie ; aussi l'élution est-elle alors arrêtée.

Nous reproduisons page suivante quelques spectres obtenus directement sur les éluats.

Après utilisation de ces 2 méthodes, impliquant hydrolyse acide au départ, nous avons pu assurer l'identification des 4 premières taches décrites (voir chromatographie bidimensionnelle de la phase butanolique de *Potamogeton natans*). Comme il nous paraissait intéressant de connaître la forme naturelle de ces différents composés flavoniques, nous avons entrepris une nouvelle séparation sur colonne de polyamide, également à partir de feuilles dégraissées mais cette fois non hydrolysées.

II - 1. 3. Extraction non hydrolytique

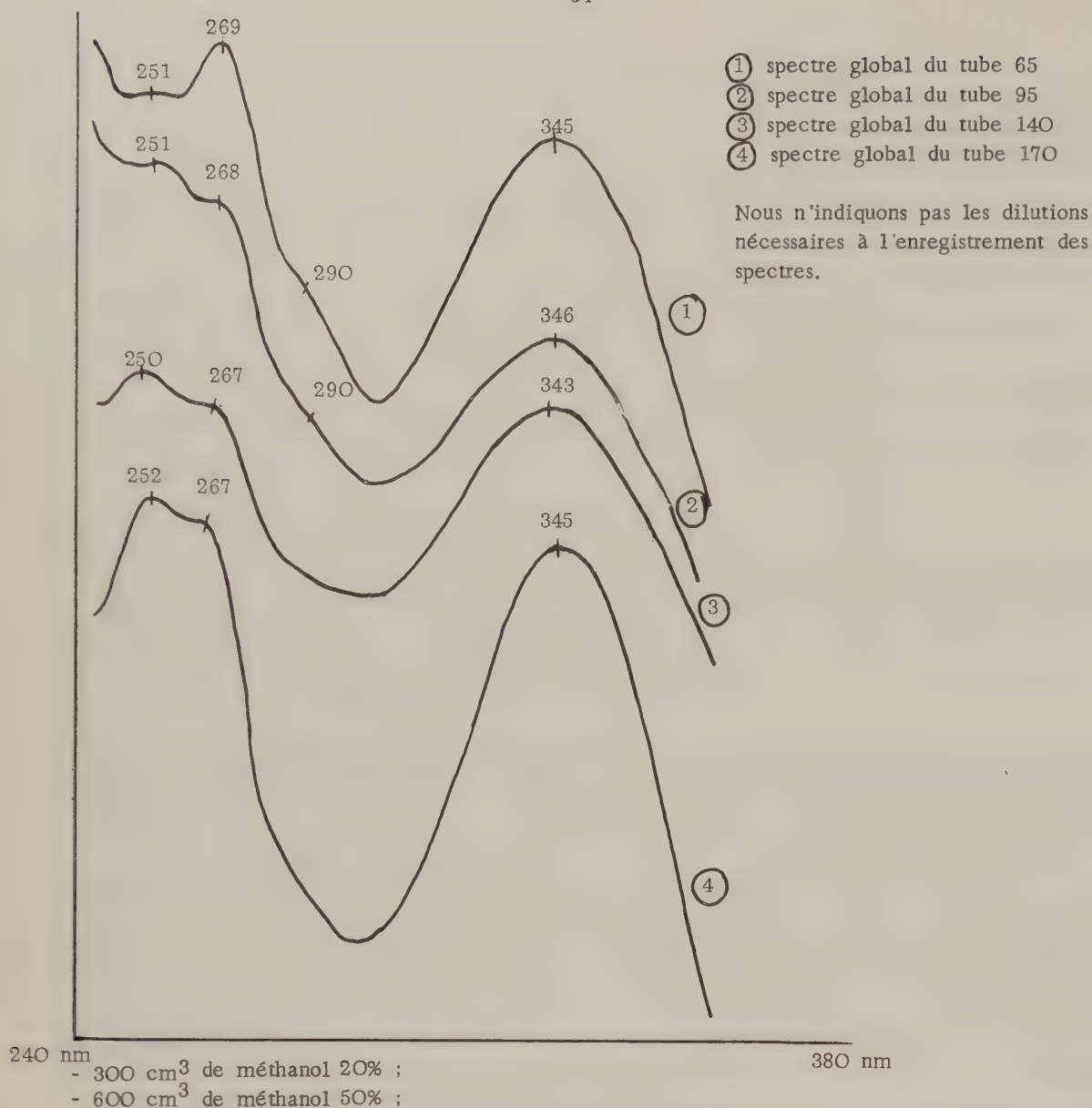
25 g de feuilles sèches, broyées, dégraissées (extraction au chloroforme et à l'éthanol absolu) sont agités dans de l'eau permutée bouillante et laissés à infuser toute une nuit. Après élimination des débris végétaux, le filtrat brun est lyophilisé.

Environ 3 g de lyophilisat sont récupérés, et dissous dans 50 cm³ d'eau avant d'être fixés, comme précédemment, sur un peu de polyamide.

La colonne renferme 250 cm³ de polyamide ; l'élution se fait avec les solvants suivants :

- 700 cm³ d'eau ;

Dès le tube n° 6, les fractions recueillies apparaissent brunes, mais n'ont ni spectre U.V., ni fluorescence caractéristique de flavonoïdes.



Jusqu'au tube n° 85, les spectres enregistrés tous les 5 tubes n'indiquent aucune absorption dans la zone 300-360 nm, correspondant habituellement à la bande I d'une flavone.

- 700 cm³ de méthanol 60% ;

Nous devons attendre le tube n° 85 pour voir s'amorcer un spectre de flavonoïde relativement pur, retrouvé jusqu'au tube n° 100. Nous appelons donc fraction A le contenu des tubes 85 à 100 qui ne révèle qu'une tache brun-violet de R_f = 0,63 dans le BAW 27%.

La fraction B, formée en rassemblant le contenu des tubes 105 à 115, se présente en chromatographie comme un mélange de 2 constituants : le même que dans la fraction A, un autre de R_f = 0,57 dans le BAW 27%, de colorations différentes avec le réactif de Bénédict.

La fraction C (tubes 115-130) est chromatographiquement pure, puisqu'elle ne présente qu'une tache noire de R_f = 0,47.

La fraction D (tubes 131 à 168) ne donne qu'une tache bleue en lumière U.V. ; de plus, les spectres des différents tubes de cette fraction ont une absorption très faible entre 300 et 380 nm.

- 400 cm³ de méthanol 70% ;
 - 400 cm³ de méthanol 80% ;

La fraction E (tubes 168 à 193) ne présente qu'une seule tache de fluorescence violette de R_f = 0,57 dans le BAW.

- 2500 cm³ de méthanol RP ;

La fraction F (tubes 193 à 212) montre la présence de 2 composés ($R_f = 0,57$ et $R_f = 0,82$; BAW) elle a été résolue ultérieurement par chromatopapier dans ce solvant et la tache supérieure a pu être identifiée.

La fraction G (tubes 213 à 244) présente aussi 2 taches brun-violet de même R_f que ci-dessus, mais se révélant différemment après vaporisation du réactif de Bénédict.

La fraction H (tubes 244-267) et la fraction I (tubes 268 à 300, c'est-à-dire en fin d'élution) renferment plusieurs taches chromatographiques de fluorescence brun-violet. En les purifiant sur papier dans le BAW 27%, nous avons pu cristalliser un produit de $R_f = 0,61$.

Au cours de ce travail préparatif que nous venons d'exposer d'un simple point de vue technique, nous avons donc isolé toute une série de composés, que leurs différentes propriétés nous ont ultérieurement permis d'identifier.

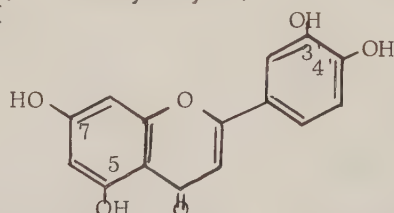
Nous allons donc maintenant formuler les résultats obtenus, c'est-à-dire donner les caractéristiques physiques de tous les flavonoïdes identifiés, en précisant la ou les fractions à partir desquelles chacun a été recueilli.

II - 2. FLAVONOÏDES MIS EN EVIDENCE

II - 2. 1. Aglycones

Deux flavones ont été identifiées à l'état libre chez Potamogeton natans.

a) Lutéoline, ou tétrahydroxy-3', 4', 5, 7 flavone :



Flavone très commune, elle existe notamment chez la gaude Reseda luteola, et a été isolée à partir de nombreuses plantes, telles que Genista tinctoria, Digitalis purpurea, Dalhia variabilis (21)..... ; le plus souvent, elle se présente sous forme de glycoside. Sa structure complète a été établie par Perkin (22) dès 1896.

Nous l'avons identifiée chez Potamogeton natans sous forme d'aglycone après hydrolyse de la plante : la lutéoline constitue en effet

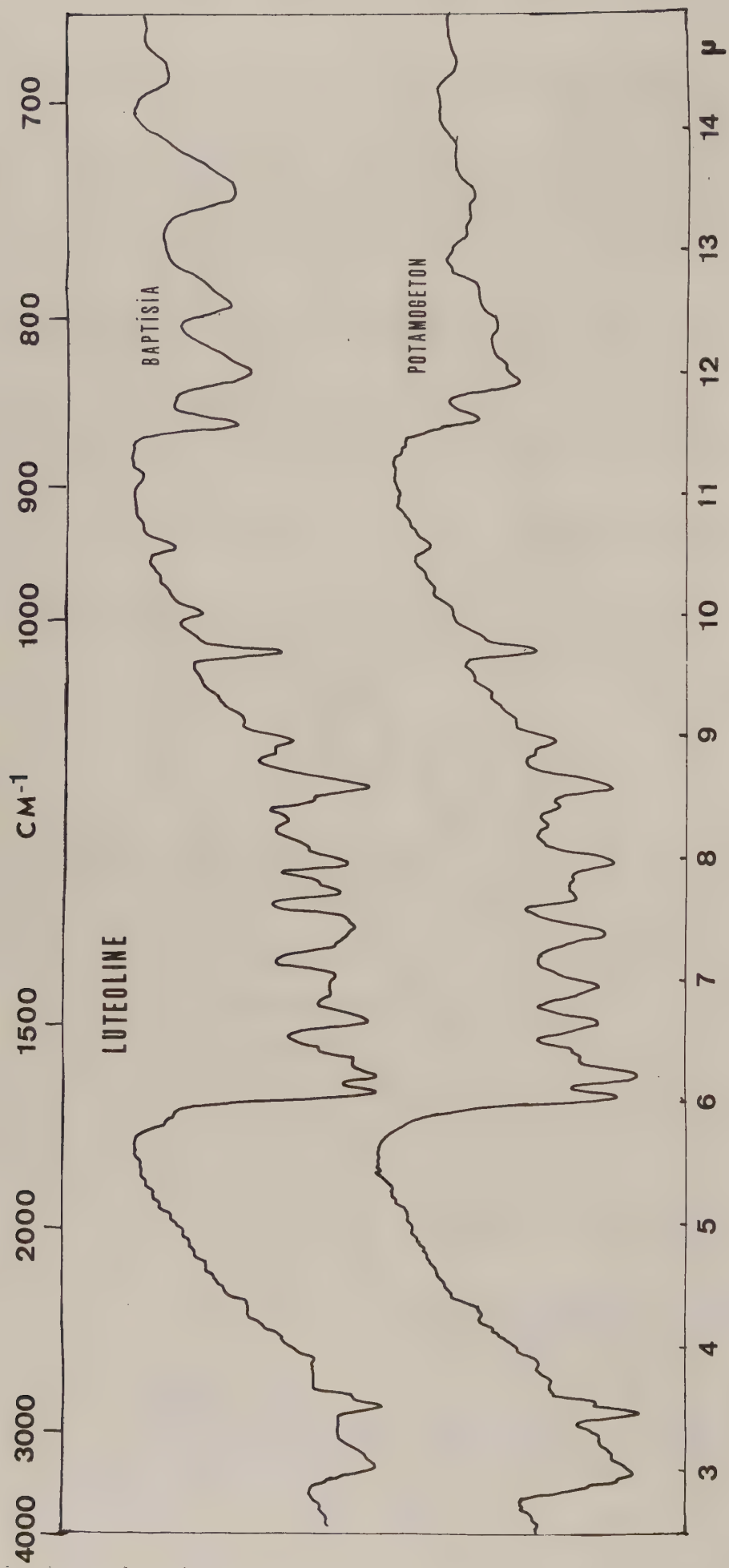
- la "bande I" ($R_f = 0,51$ / AcOH 60%) obtenue à partir de l'extrait étheré (cf. II - 1. 2. ; p.31) ;
- le flavonoïde de R_f supérieur dans le BAW, obtenu par purification de la fraction G du "décocté" non hydrolysé (Cf. II - 1. 3.).

Comportement chromatographique :

- Fluorescence brun-violet en lumière U.V. ; après vaporisation de réactif de Bénédict, révélation en noir.
- Sur papier,
 - $R_f = 0,50 - 0,52$ dans l'acide acétique 60% ;
 - $R_f = 0,26$ (trainée) dans le solvant de Winicki ;
 - $R_f = 0,83$ dans le BAW 27%.
- Sur plaque de gel de silice,
 - $R_f = 0,18$ dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique ;
 - $R_f = 0,14$ dans Benzène-Pyridine-Ammoniaque.

Comportement spectral U.V. :

Ethanol à 95° :	255, 268, 293, 353 nm.	
Acétate de Na :	268, 326, 390 nm.	$\Delta\lambda_{II} = + 13$ nm et $\Delta\lambda_I = + 37$ nm.
Acide borique :	259, 294, 375 nm.	$\Delta\lambda_{II} = + 22$ nm.
AlCl ₃ (neutre) :	264, 274, 298, 362, 392 nm.	$\Delta\lambda_I = + 39$ nm.
NaOH :	274, stable 412 nm.	$\Delta\lambda_I = + 59$ nm.



Spectre infra-rouge :

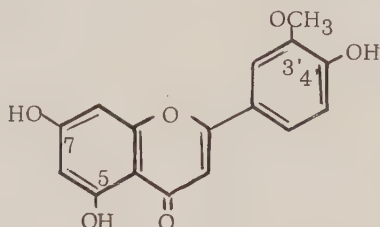
Un essai de purification sur colonne d'acide silicique ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. Le solide jaune obtenu étant mal cristallisé, le spectre était beaucoup moins bien résolu que celui du témoin.

Lors de la séparation non hydrolytique toutefois, nous avons identifié ce produit à l'état d'aglycone libre grâce au spectre I.R.. Il faut remarquer, à propos du spectre I.R. de la lutéoline, qu'il en existe deux formes différentes ; la flavone de Potamot est du type Baptisia.

Etat naturel :

La lutéoline a été identifiée à l'état d'aglycone à partir des feuilles de Potamot hydrolysées. Mais elle a été obtenue également par purification de la fraction G du "décocté" non hydrolysé ; c'est pourquoi nous pouvons affirmer l'existence de l'aglycone lutéoline à l'état naturel dans la plante, en quantité toutefois un peu plus faible que celle obtenue après hydrolyse.

b) Chrysoériol, ou trihydroxy-4', 5, 7 méthoxy-3' flavone :



Cette flavone a été découverte chez Eriodictyon glutinosum par Power et Tutin (23) en 1906.

Chez Potamogeton natans, le chrysoériol a été rencontré plusieurs fois au cours de l'analyse flavonique ; il constitue :

- la bande II ($R_f = 0,60$ / AcOH 60%) de l'extrait étheré (cf. II - 1. 2 . p. 31) ;
- la fraction de ce même extrait, élue par de l'acétone à 20% dans le chloroforme (fraction 6), sur colonne d'acide silicique (cf. II - 1. 2 ., p. 31) ;
- enfin la bande supérieure de purification sur papier de la fraction F, celle-ci résultant du passage du "décocté" non hydrolysé sur polyamide (cf. II - 1. 3., p. 35).

Comportement chromatographique :

- Fluorescence violette, devenant jaune-vert en présence de réactif de Bénédict. (jaune en lumière visible).
- Sur papier,
 - $R_f = 0,60$ dans l'acide acétique à 60% ;
 - $R_f = 0,32$ dans le solvant de Winicki ;
 - $R_f = 0,86$ dans le BAW 27%.
- Sur plaque de gel de silice,
 - $R_f = 0,49$ dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique ;
 - $R_f = 0,26$ dans Benzène-Pyridine-Ammoniaque.

Comportement spectral (U.V.) :

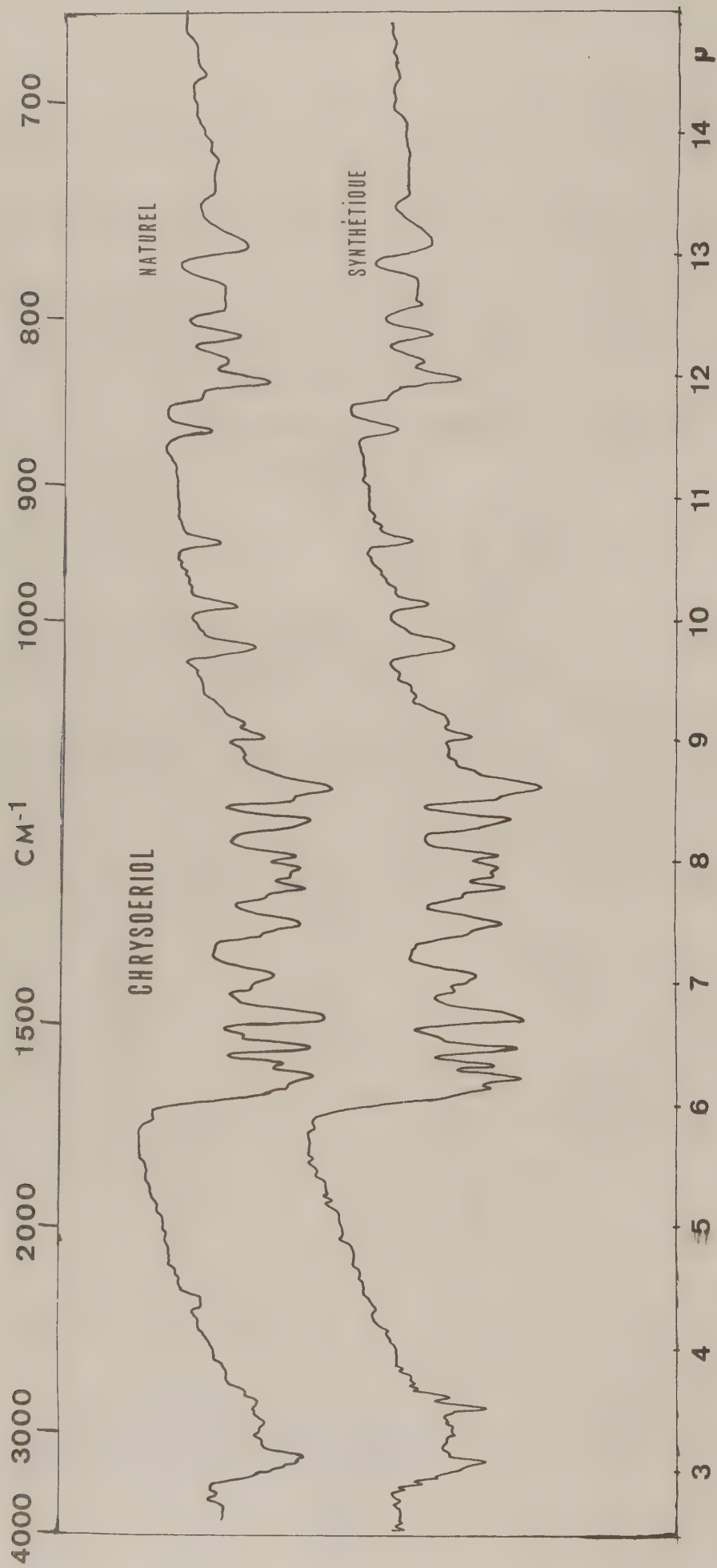
Ethanol à 95° :	$\tilde{\nu}$ 249, $\tilde{\nu}$ 268, $\tilde{\nu}$ 290, 348 nm.	
Acétate de Na:	272, 376 nm.	$\Delta\lambda_{II} = + 13 \text{ nm} ; \Delta\lambda_I = + 28 \text{ nm}.$
Acide borique :	268, 349 nm.	$\Delta\lambda_{II} \neq \pm 0 \text{ nm}.$
AlCl ₃ (neutre) :	282, 360, 392 nm.	$\Delta\lambda_I = + 44 \text{ nm}.$
Ethylate de Na:	279, stable 410 nm.	$\Delta\lambda_I = + 62 \text{ nm}.$

Spectre infra-rouge :

La cristallisation est obtenue dans le méthanol RP, additionné de quelques gouttes d'eau. Le spectre obtenu est identique à celui d'un témoin.

Etat naturel :

Le chrysoériol a été identifié comme tel à partir de feuilles de Potamot soumises à l'hydrolyse acide ; mais, ayant pu l'obtenir également après purification (par passage dans BAW 27%) de la fraction F du "décocté" non hydrolysé, nous pouvons conclure qu'il existe,



au moins en partie, comme aglycone (*) à l'état naturel chez Potamogeton natans.

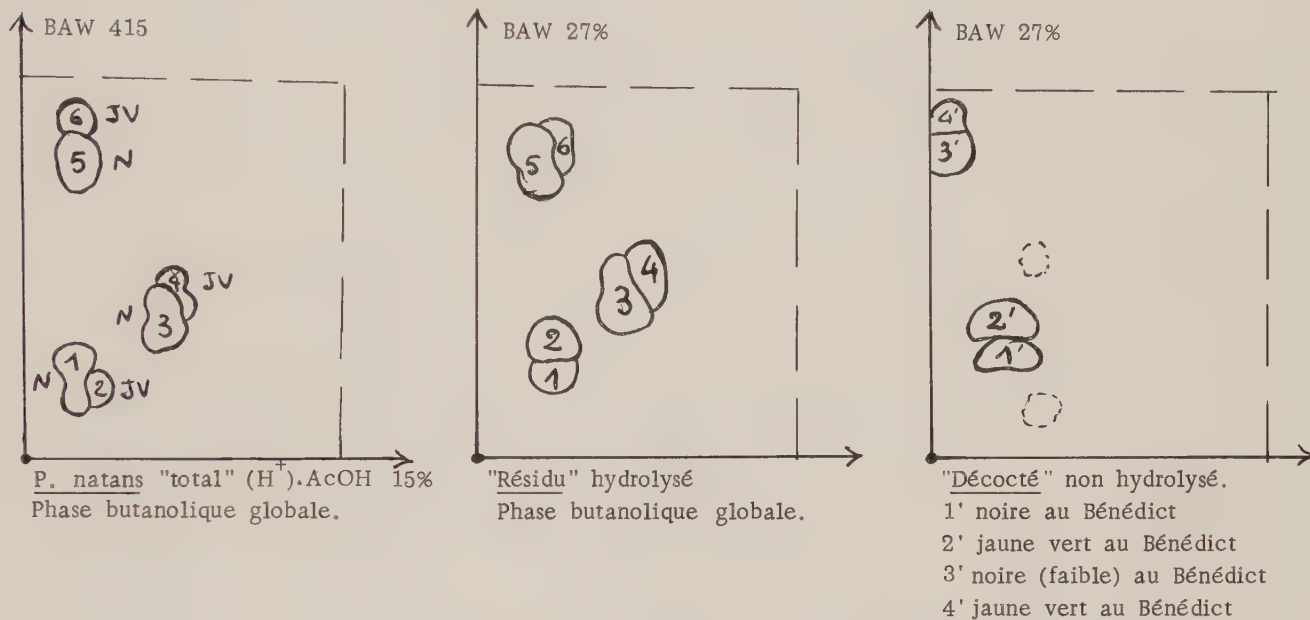
II - 2. 2. C-glucosylflavones

Sous ce titre, nous avons rassemblé les résultats concernant l'identification de 4 C-glucosyl-flavones rencontrées chez Potamogeton natans :

- Homoorientine et orientine, dérivées de la lutéoline ;
- Isoscoparine et scoparine, dérivées du chrysoériol.

Nous nous proposons, par analogie avec les aglycones, de les décrire dans l'ordre indiqué ci-dessus.

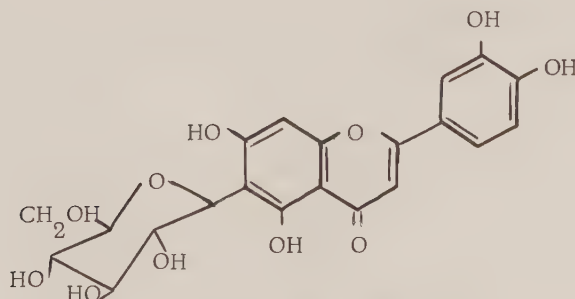
Pour mieux les situer au cours de l'exposé, nous reproduisons ci-dessous les chromatogrammes bidimensionnels (BAW, puis acide acétique 15%) des différents extraits globaux obtenus à partir de la plante.



On constate qu'il y a une grande ressemblance entre les résultats fournis par la phase butanolique de l'hydrolysate de Potamot et le résidu dégraissé hydrolysé lui aussi ; par contre, le "décocté" non hydrolysé se présente très différemment.

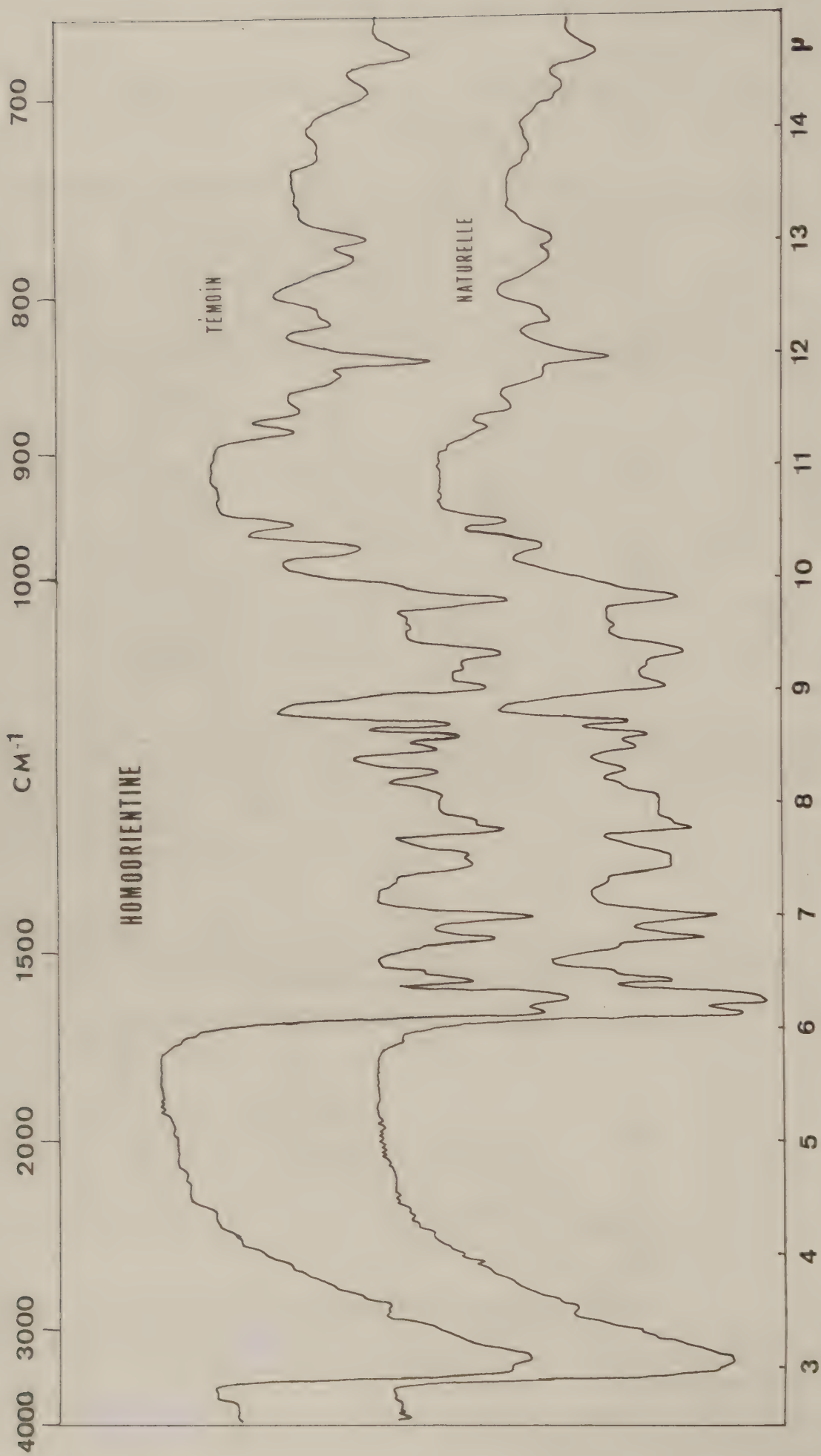
a) Homoorientine, ou C- β -D glucopyranosyl-6 lutéoline (C₂₁H₂₀O₁₁)

M = 448



Ce composé a été obtenu initialement par Hörhammer, Wagner et Gloggengieser (24), par hydrolyse acide de l'orientine isolée des feuilles de Polygonum orientale ; plus récemment, Koeppen, Smit et Roux (25) l'ont isolée, en même temps que l'orientine, à partir des feuilles d'Aspalathus acuminatus.

(*) On ne peut exclure toutefois la libération enzymatique à partir de glycosides lors de la récolte et du séchage du matériel végétal ; cette explication pouvant peut-être aussi justifier la présence de lutéoline, précédemment décrite.



Dans le cas de Potamogeton natans, l'homoorientine a été isolée dans les fractions suivantes :

- bande 3 ($R_f = 0,45$ / BAW 415) d'élution des chromatographies préparatives sur papier de la phase butanolique d'hydrolyse (cf. II - 1. 2. p. 32) ;
- fractions c et d de la même phase butanolique d'hydrolyse, traitée sur polyamide (cf. II - 1. 2. p. 33) ;
- fractions B et C du "décocté" non hydrolysé traité sur polyamide (cf. II - 1. 3. p. 34).

Comportement chromatographique :

- en présence de divers réactifs, les taches brun-violet en lumière U.V. (350 nm) deviennent :
noires en U.V. avec le réactif de Bénédict ;
jaune-orangé à la lumière visible avec ce même réactif ;
jaune-orangé en U.V. avec le carbonate de sodium ;
beige-brun à la lumière visible avec la benzidine bisdiazotée.
- sur papier, l'homoorientine migre à :
 $R_f = 0,45$ dans le BAW 415 ;
 $0,57$ dans le BAW 27% ;
 $0,60$ dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (10-2-3) ;
 $0,34$ dans l'acide acétique à 15%.
- sur plaque de gel :
 $R_f = 0,63$ dans le solvant "5.3.1.1." ;
 $0,16$ dans le solvant "APEM".
- sur plaque de cellulose :
 $R_f = 0,67$ dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (65-15-20).

Comportement spectral :

- Spectres U.V. :

Méthanol RP : 255, 271, 349 nm.

Acétate de Na : 276, 323, 393 nm. $\Delta\lambda_I = + 21$ nm et $\Delta\lambda_{II} = + 44$ nm.

Acide borique : 265, 377 nm. $\Delta\lambda_I = + 28$ nm.

$AlCl_3$: 278, 302, 332, 392 nm. $\Delta\lambda_I = + 43$ nm.

NaOH : stable 412 nm. $\Delta\lambda_I = + 63$ nm.

- Spectre I.R. :

La cristallisation a été conduite dans le méthanol 50%. Le spectre obtenu est rigoureusement identique à celui de l'homoorientine témoin (cf. figure page ci-contre).

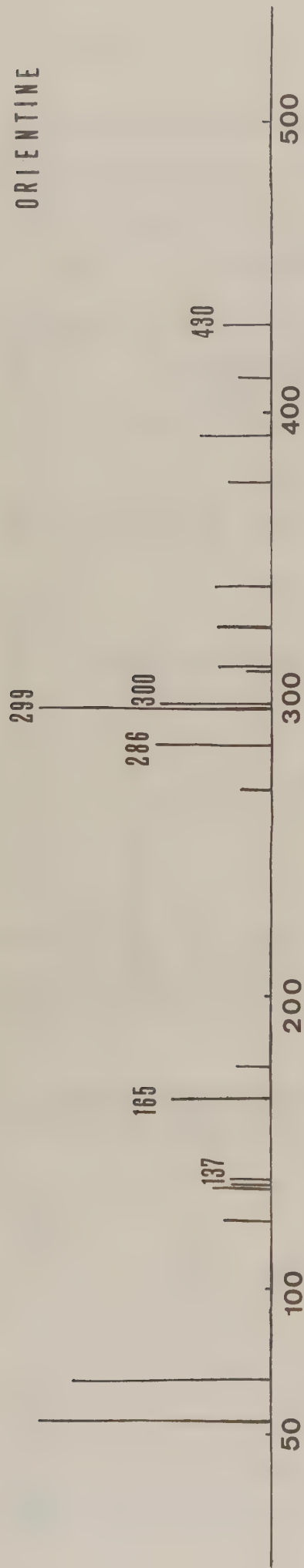
Ce spectre a été possible non seulement à partir d'une fraction d'hydrolysate, mais également à partir du résidu non hydrolysé, ce qui permet d'affirmer l'existence de l'homoorientine naturelle chez Potamogeton natans.

- Spectre de masse :

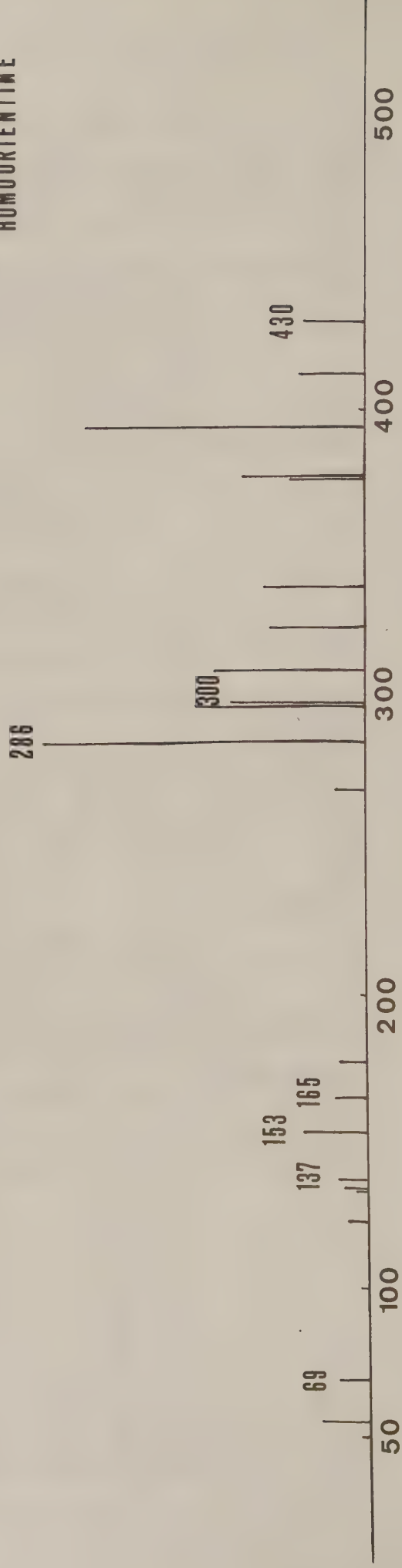
Le relevé du spectre de masse, dont nous avons rapporté ici seulement les pics caractéristiques, se trouve p. 42 ; on y relève les fragments suivants, correspondant au schéma de dégradation de Prox (entre parenthèses est indiquée l'importance relative) :

M (ion moléculaire)	= 448 (absent)
M - H_2O	430 (18%)
M - $2H_2O$	412 (20%)
M - $3H_2O$	394 (87%)
M - 72	376 (24%) et 377 (38%)
M - 108	340 (31%)
M - 122	326 (29%)
M - 137	311 (47%)
M - 148	300 (42%) Aglycone + CH_2
M - 149	299 (53%)
M - 162	286 (100%) Aglycone = Lutéoline
M - 178	270 (9%)
M = A_1 = 165	165 (9%) Noyau A + CH_2

ORIENTINE



HOMOORIENTINE



$A_5 = 137$	137 (9%)	} Noyau B
$A_4 = A_3 + 1$	134 (7%)	
$A_3 = 133$	133 (4%)	
$A'_1 = 123$	123 (5%)	Noyau A = 165 = C_2H_2O
69	69 (9%)	
55	55 (14%)	

b) Orientine, ou C- β -D glucopyranosyl-8 lutéoline :

Ce produit a été isolé et identifié à l'état naturel dans Polygonum orientale par Hörhammer, Wagner et Gloggengiesser (24) en 1957 ; plus récemment, Koeppen et coll. (26) en ont démontré la structure.

L'orientine présente des propriétés spectrales U.V. analogues à celles de la lutéoline, mais son comportement chromatographique est celui d'un glucoside.

Dans le cas de Potamogeton natans, l'orientine a été caractérisée par ses spectres U.V. et I.R., après séparations chromatographiques réalisées sur la phase butanolique d'hydrolyse. Elle a été isolée à partir :

- de la bande 1 ($R_f = 0,42$ / BAW 415) d'élution des chromatographies préparatives sur papier de la phase butanolique d'hydrolyse (cf. II - 1. 2. p.32) ;
- de la fraction d de la phase butanolique du résidu dégraissé hydrolysé, passé sur polyamide : (p. 33).

Comportement chromatographique :

- sur papier :

$R_f = 0,40$ dans BAW 415 ;
0,48 dans BAW 27% ;
0,46 dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (10-2-3).

- sur plaque de gel de silice :

$R_f = 0,75$ dans le solvant "5.3.1.1." ;
0,26 dans le solvant "APEM".

Comportement spectral :

- Ethanol 95° : 256, 268, 290, 350 nm.
- Acétate de Na : 278, 330, 383 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 22$ nm et $\Delta\lambda_I = + 33$ nm.
- Acide borique : 262, 376 nm. $\Delta\lambda_I = + 26$ nm.
- $AlCl_3$ (neutre) : 275, 295, 357, 405 nm. $\Delta\lambda_I = + 55$ nm.

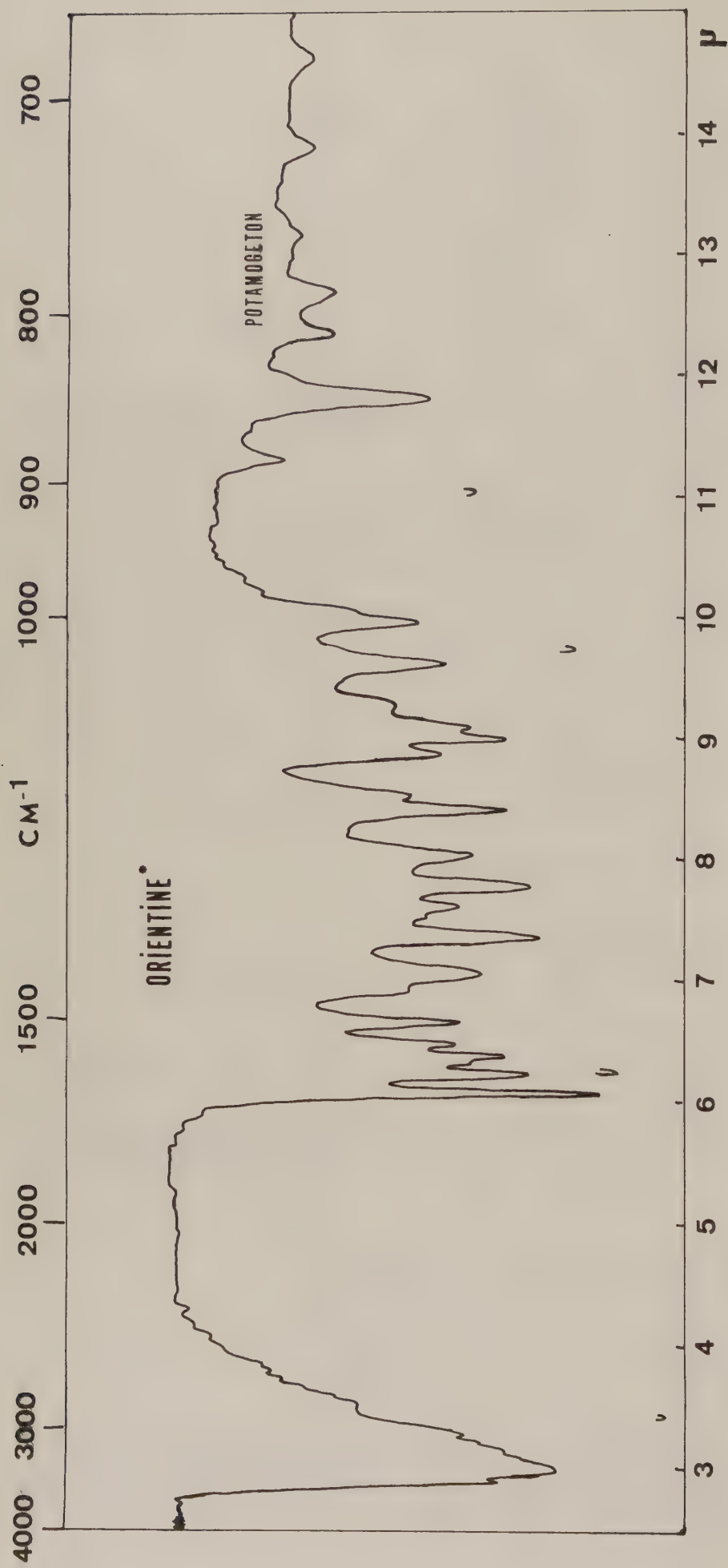
Le spectre I.R. obtenu est identique à celui de l'orientine de Polygonum orientale (*), fourni par Wagner et coll. (25) ; voir figure p. 44 .

Les spectres de masse de l'orientine et de l'homoorientine sont représentés p. 42 . Les intensités relatives des pics principaux de l'orientine indiquées entre parenthèses, sont assez différentes de celles de la glucosyl-6 lutéoline qui se fragmente pourtant qualitativement de la même manière.

Schéma de dégradation :

M = 448 (ion moléculaire)	448 (absent)
M - H_2O	430 (20%)
M - $2H_2O$	412 (12%)
M - $3H_2O$	394 (30%)
M - 72	376 (17%)
M - 108	340 (25%)

(*) le spectre I.R. de l'orientine de Potamo est en fait identique à celui de l'orientine de Polygonum orientale (spectre I.R. publié en 1959 (25)). En fait ce dernier spectre est un peu différent de celui de la même orientine du même Polygonum, publié un an auparavant (24).



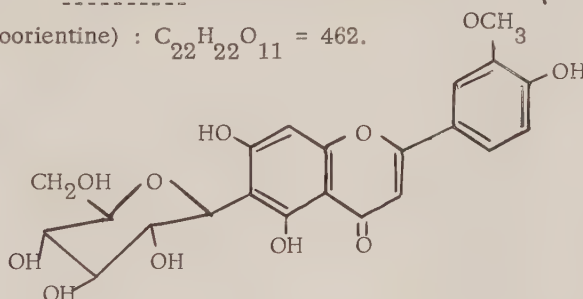
* identique au spectre fourni par Wagner [Arch. Pharm., 292, 64, 83, 1959]

M - 122	326 (22%)
M - 137	311 (10%)
M - 148 = A'	300 (47%) = Aglycone + CH ₂
M - 149 = A	299 (100%)
M - 162	286 (50%) = Aglycone
M - 178	270 (12%)
A ₁ = 165	165 (42%) = Noyau A
A ₅ = 137	137 (17%)
A ₄ = A ₃ + 1	134 (17%)
A ₃ = 133	133 (25%)
A' ₁ = 123	123 (20%)
	69 (20%)
	55 (100%)

Conclusion :

L'orientine n'existe apparemment pas à l'état naturel chez Potamogeton natans, et sa présence dans les fractions d'hydrolyse peut s'expliquer par isomérisation acide de l'homoorientine ; cependant la forte teneur après hydrolyse (environ 2 fois moins concentrée seulement que l'homoorientine) n'exclue pas l'existence d'un O-glycoside correspondant à l'état naturel. En effet, lorsqu'un seul C-glycoside existe à l'état naturel, après hydrolyse, les proportions de l'isomère sont de 1/4 pour 3/4 du produit "naturel" (d'après des observations faites dans notre laboratoire sur des C-glycoflavones chez les Gentianacées).

c) Isoscoparine (= isoscoparoside) (*), ou C-β-D glucopyranosyl-6 chrysoériorol, (ou méthyl-3' homoorientine) : C₂₂H₂₂O₁₁ = 462.



Jusqu'à ce jour, ce produit n'existait pas avec certitude à l'état naturel (si ce n'est sous la forme de glycoside en 7 dans Hordeum vulgare (27)), mais il avait été préparé par synthèse à partir du chrysoériorol et de l'acétobromoglucose (28).

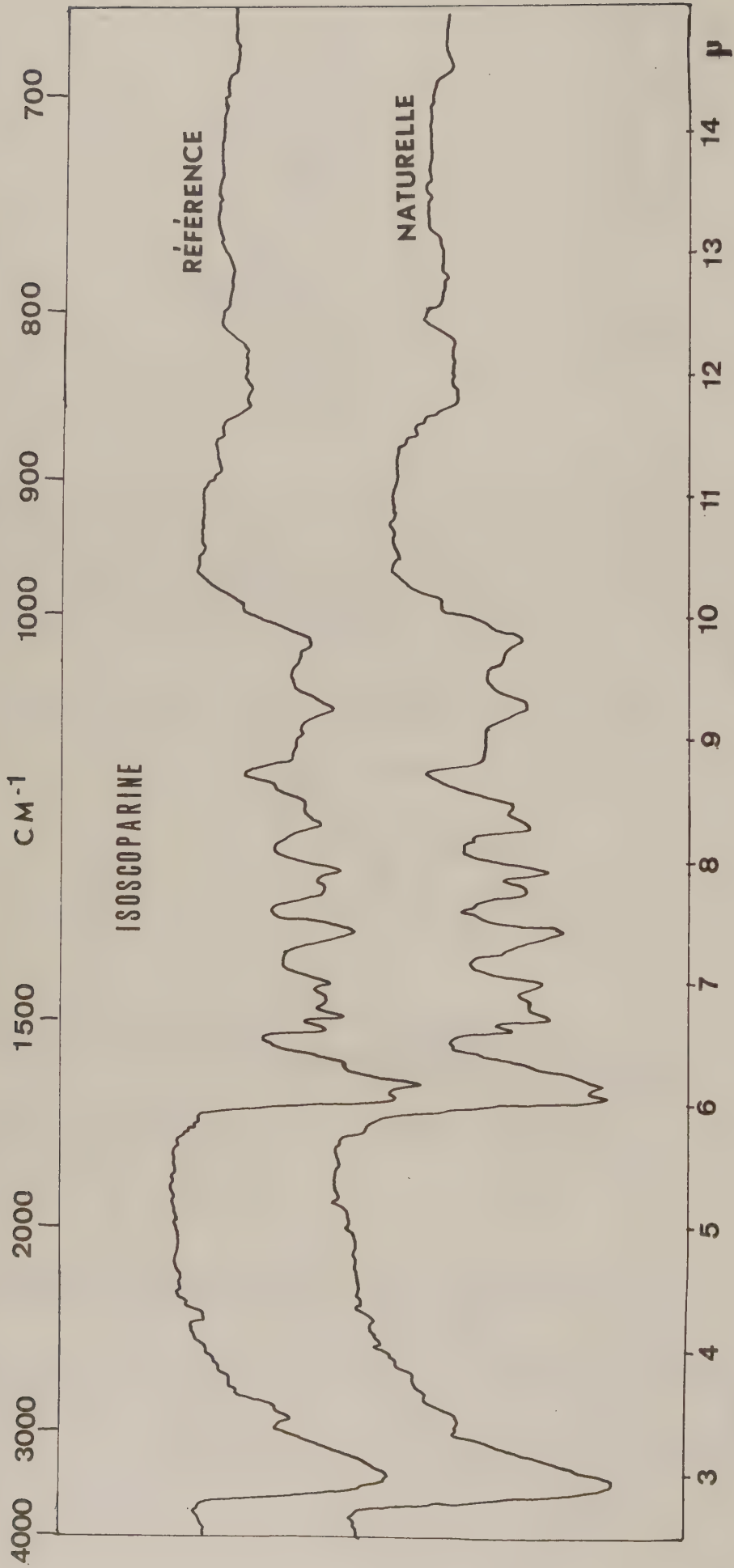
L'isoscoparine constitue :

- la bande 4 d'élution des chromatographies préparatives sur papier de la phase butanolique d'hydrolyse (cf. II - 1. 2. p. 32) ;
- les fractions a et b de la phase butanolique d'hydrolyse du "résidu" passé sur polyamide (cf. II - 1. 2. p. 33) ;
- la fraction A et une partie de B du "décocté" non hydrolysé passé sur polyamide (cf. II - 1. 3. p. 34).

Il est intéressant de noter que, sur colonne de polyamide, l'isoscoparoside est le premier glycoflavonoïde élué par un gradient méthanol-eau.

Comportement chromatographique :

- La tache de fluorescence brun-violet en U.V. (350 nm) devient jaune-vert après vaporisation soit



de réactif de Bénédict soit de carbonate de sodium.

A la lumière visible, cette même tache apparaît jaune après vaporisation de réactif de Bénédict ; elle devient rouge-orangé après addition de benzidine diazotée.

- Sur papier, l'isoscoparine migre à :

Rf = 0,58 dans le BAW 415 ;

0,58 dans le BAW 27% ;

0,78 dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (10-2-3).

- Sur plaque de gel,

Rf = 0,65 dans le solvant "5.3.1.1." ;

0,80 dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (65-15-20).

Comportement spectral U.V. :

- Méthanol RP : 242, 251, 270, 346 nm.

- Acétate de Na: 277, 320, 387, 402 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 26$ nm

- Acide borique: 271, 345 nm. $\Delta\lambda_{I} = + 0$ nm

- $AlCl_3$ (neutre): 260, 278, 297, 360, 390 nm. $\Delta\lambda_{I} = + 44$ nm.

- NaOMe : stable 408 nm. $\Delta\lambda_{I} = + 62$ nm.

Le spectre I.R. des cristaux, obtenus, avec le méthanol 60% comme solvant, soit après hydrolyse soit à partir du produit naturel, est identique à celui d'un témoin, (voir p. 46 et 48), appelé "naturel" car il provient de l'isomérisation acide de la scoparine naturelle.

Spectre de masse :

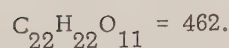
La reproduction du spectre de masse se trouve p.48; nous reportons ci-dessous les principaux pics de fragmentation :

M = 462 (ion moléculaire)	462 (absent)
M - H_2O	444 (15%)
M - $2H_2O$	426 (11%)
M - $3H_2O$	408 (100%)
M - 69	393 (33%)
M - 72	390 (37%)
M - 108	354 (26%)
M - 122	340 (48%)
M - 149 = A	313 (44%) et 312 (33%)
M - 148 = A'	314 (18%) = Aglycone + CH_2
M - 162	300 (55%) = Aglycone
$A_1 = 165$	165 (11%)
$A'_1 = 123$	123 (11%)
$A_5 = 151$	151 (15%)
$A_4 = A_3 + 1$	148 (15%)
$A_3 = 147$	147 (7,5%)
	69 (18%)
	55 (41%)

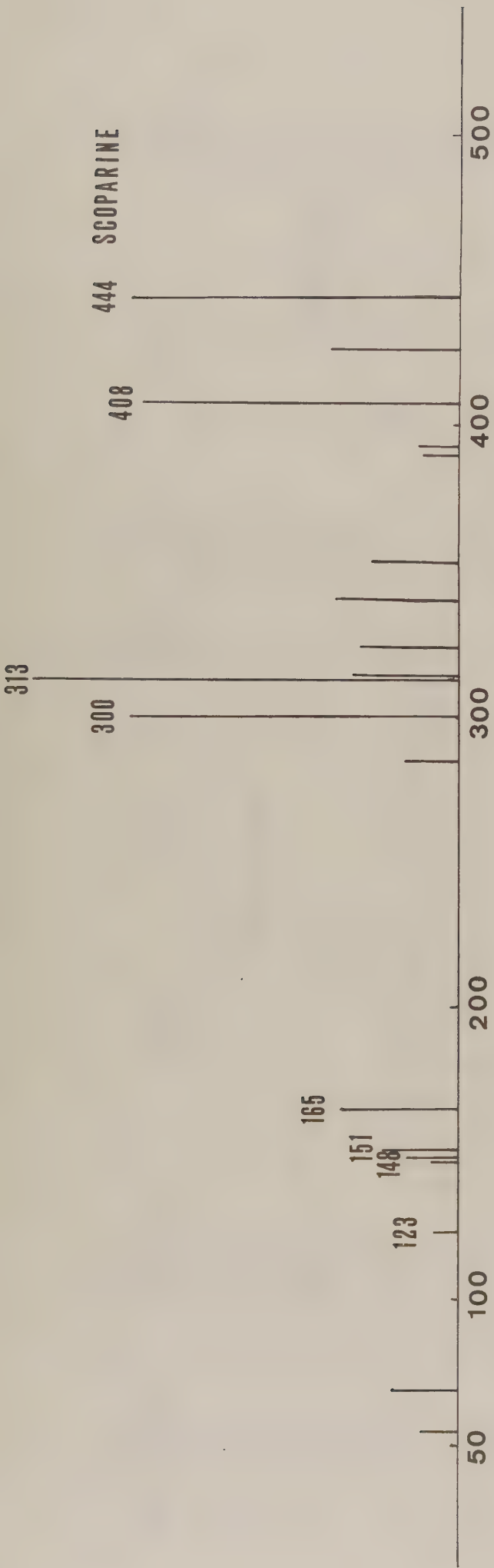
Conclusion :

L'isolement de l'isoscoparine à partir de Potamogeton natans constitue la première mise en évidence de cette C-glucosylflavone à l'état naturel ; une tache chromatographique obtenue à partir d'extraits de Lemna a été rapportée sans autre, par MABRY, à une telle structure.

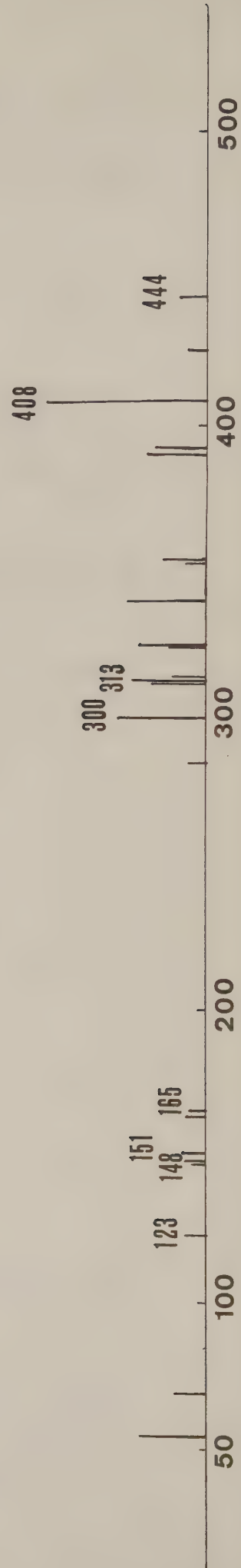
d) Scoparine, ou C- β -D glucopyranosyl-8 chrysoériol (ou méthyl-3' orientine) :



Elle a été isolée du Genêt Sarothamnus scoparius par Stenhouse (29) dès 1851 ; en 1900, Perkin (30) la rapprocha de la vitexine en raison de la similitude de leurs propriétés :



ISOSCOPARINE



c'est à la suite d'une dégradation alcaline qu'il put conclure que la scoparine était une méthoxyvitexine, ce qui fut confirmé ultérieurement par les travaux de Paris et Stambouli (31), et ceux de Hörhammer, Wagner et Beyersdorff (32).

La scoparine constitue :

- la bande 2 (Rf = 0,42 / BAW 415) d'élution des chromatographies préparatives de la phase butanolique d'hydrolyse (cf. II - 1. 2. p. 32)
- les fractions b et c de la phase butanolique d'hydrolyse du "résidu" dégraissé, passé sur polyamide (cf. II - 1. 2. p. 33).

Comportement chromatographique :

- Fluorescence et révélation sont les mêmes que dans le cas de l'isoscoparine.
- Sur papier, la scoparine migre à :
 $R_f = 0,42$ dans le BAW 415 ;
 $0,50$ dans le BAW 27% ;
 $0,55$ dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (10-2-3).

Sur plaque de gel :

$R_f = 0,78$ dans le solvant "5.3.1.1." ;
 $0,71$ dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (65-15-20).

Comportement spectral U.V. :

- Ethanol à 95° : 256, 270, 290, 350 nm.
 - Méthanol RP : 250, 268, 290, 345 nm.
 - Acétate de Na : 270, 278, 320, 378 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 20$ nm. ; $\Delta\lambda_I = + 33$ nm.
 - Acide borique : 250, 270, 343 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 0$ nm.
 - $AlCl_3$ (neutre) : 262, 276, 296, 355, 387 nm. $\Delta\lambda_I = + 37$ nm.
- dans EtOH 95°

Le spectre I.R. (voir p. 50) est identique à celui de la scoparine témoin.

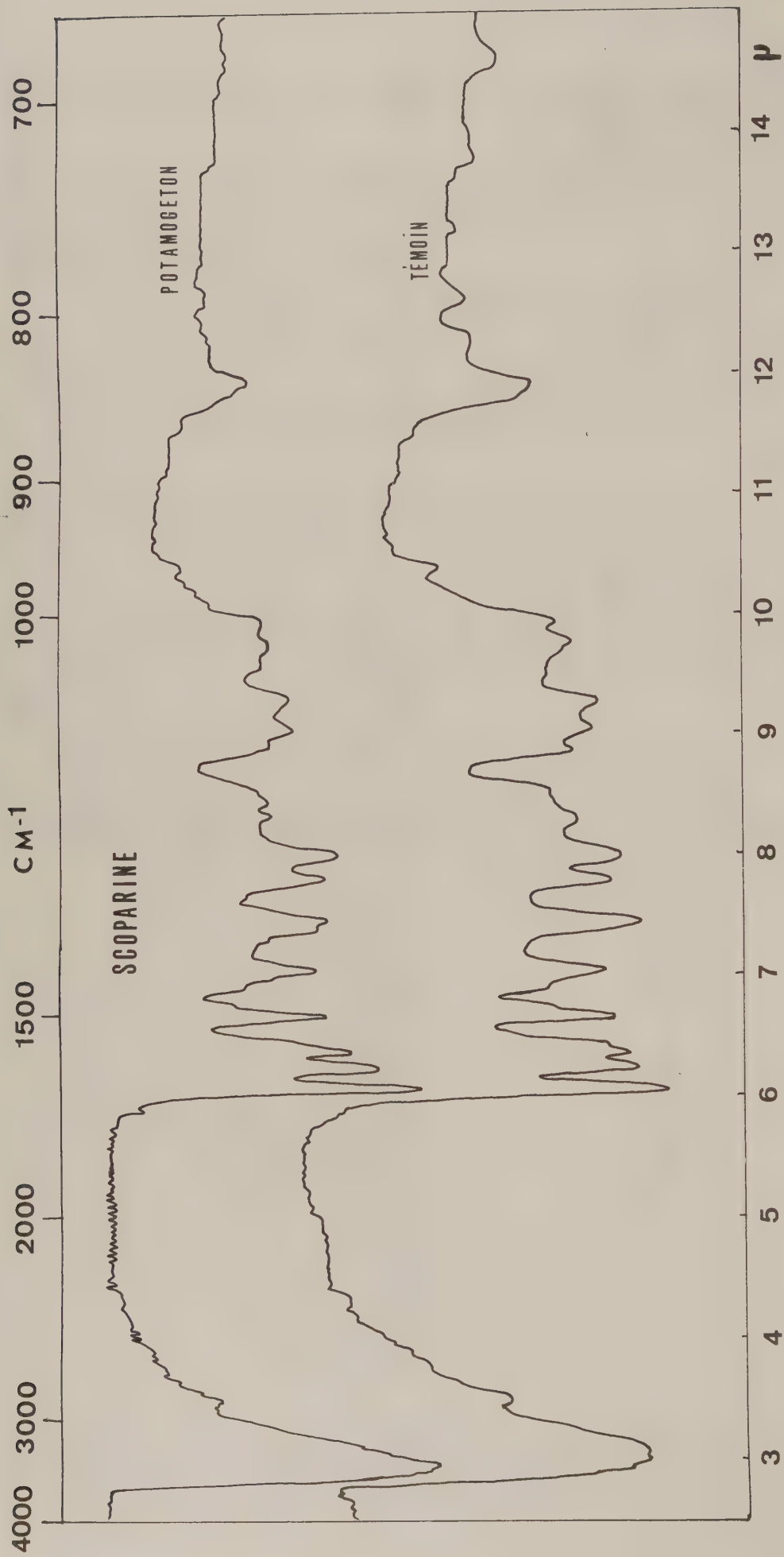
Spectre de masse (voir p. 48) :

Nous retrouvons les mêmes séquences de fragmentation que dans le spectre de l'isoscoparine. Toutefois, comme dans le cas des 2 C-glucosyllutéolines isomères, l'intensité de certains pics "types" varie entre le composé substitué en 6 et celui substitué en 8.

M = 462 (ion moléculaire)	462 (absent)
M - H_2O	444 (77%)
M - $2H_2O$	426 (30%)
M - $3H_2O$	408 (77%) (74%)
M - 69	393 (9%)
M - 72	390 (8%)
M - 109	353 (20%)
M - 122	340 (28%)
M - 148 = A'	314 (24%)
M - 149 = A	313 (100%) = Aglycone + CH_2
M - 162	300 (77%) = Aglycone
M = 165 = A_1	165 (27%)
$A'_1 = 123$	123 (5%)
} Noyau A	
A_5	151 (17%)
$A_4 = A_3 + 1$	148 (12%)
A_3	147 (7%)
} Noyau B	
	69 (15%)
	55 (8%)

Conclusion :

La scoparine, identifiée seulement après hydrolyse acide, n'existe pas à l'état



naturel chez Potamogeton natans. Sa présence, comme celle de l'orientine, peut s'expliquer par une isomérisation de l'isoscoparine, sans exclure toutefois sa possibilité d'existence sous forme d'un dérivé O-glycosylé.

Avant de terminer cet exposé sur les 4 C-glucosylflavones dûment identifiées chez Potamogeton natans, nous voudrions revenir sur un détail d'interprétation de leurs spectres de masse. Prox, comme nous l'avions indiqué dans le premier chapitre, signale que deux isomères peuvent être distingués par comparaison de l'intensité des pics A' ($A' = A + 1$) des deux spectres : l'ion A' de la C-6 glucoflavone serait plus intense que celui de la C-8 homologue ; ces observations sont basées sur l'apigénine et ses dérivés.

Dans le cas de l'orientine et de l'homoorientine, nous observons ici le contraire (le pic 299 est plus faible dans le cas de l'homoorientine que dans celui de l'orientine). En ce qui concerne les dérivés du chrysoériol, c'est aussi le contraire qui est observé : le pic 314 est plus fort sur le spectre de la scoparine (C-8) que sur celui de l'isoscoparine (C-6).

Nous nous proposons d'aborder maintenant l'étude de la dernière tache chromatographique III, (représentée en II - 1. 2. b). Celle-ci appelée "X", nous l'avons déjà signalé, est obtenue après hydrolyse et composée de deux produits (X_1 et X_2) qu'il ne nous a pas été possible d'identifier par l'examen immédiat des critères habituels. Nous avons donc entrepris l'isolement d'une plus grande quantité de substance, amorcé une étude structurale, et recherché également l'état naturel de ces composés "Pro-X".

II - 2. 3. "X" et "Pro-X"

II - 2. 3. 1. Exposé général

Dès la première chromatographie, effectuée à partir d'un hydrolysât de Potamot, nous avons noté l'existence en quantité importante, d'un flavonoïde ayant à la fois des propriétés d'aglycone (R_f élevé dans BAW) et de glycoside (R_f relativement élevé dans les solvants aqueux).

Ce que nous considérions alors comme un seul composé "X", donnait en U.V. une large tache brun-violet, se révélant en jaune en milieu alcalin.

La séparation chromatographique nous a permis d'isoler un produit cristallisant dans le méthanol en aiguilles jaune pâle (20 mg), dont nous avons déterminé les caractéristiques spectrales U.V. et I.R. et le spectre de masse.

Les spectres U.V. sont en faveur d'une structure de type lutéoline, ne pouvant cependant être homologuée à aucun produit déjà décrit.

Mais l'utilisation comme révélateur chromatographique du réactif de Bénédict, nous a ultérieurement permis de constater que "X" était en fait un mélange (dans les proportions 4/1) de deux flavonoïdes : l'un, produit principal " X_1 ", se révèle en noir en U.V., tandis que l'autre, " X_2 " se présente (dans BAW) comme un large ourlet jaune-vert à la partie supérieure de la tache globale.

A ce point des recherches, nous nous sommes efforcée de trouver un solvant séparant plus nettement ces deux constituants, et nous avons finalement adopté l'acide acétique à 60%, grâce auquel les composés " X_1 " ($R_f = 0,72$) et " X_2 " ($R_f = 0,80$) sont nettement différenciés sur papier Whatman I.

A ce stade, après un nombre considérable de chromatographies préparatives préliminaires dans le BAW (415 ou 27%) permettant de séparer globalement la bande "X", nous avons rechromatographié l'éluat correspondant dans l'acide acétique à 60%, sans pouvoir toutefois obtenir une quantité suffisante des deux constituants " X_1 " et " X_2 ".

Aussi avons-nous réitéré les opérations d'hydrolyse à une plus grande échelle, et purifié les extraits sur colonne de polyamide ; les opérations correspondantes ont été décrites au début de ce chapitre, et nous rappellerons seulement ici que " X_2 " a été recueilli dans les fractions f (produit pur) et g (en mélange avec " X_1 "), tandis que " X_1 " constitue les fractions g (en mélange avec " X_2 "), h et i.

La purification finale de ces diverses fractions a nécessité soit, pour les fractions pures, une filtration sur une petite colonne de polyamide, soit, pour les mélanges, un passage intermédiaire sur papier (Acide acétique 60%).

Ces diverses opérations nous ont permis l'obtention de 25, puis 44 mg de "X₁", et de 15 mg de "X₂". Un dosage approché, ne négligeant pas les quantités de produits contenus encore dans les eaux mères, conduit à un taux de récupération de "X₁" de un pour mille par rapport à la plante sèche.

Nous aborderons maintenant l'étude de ces deux composés, en exposant tout d'abord les résultats obtenus lors de l'étude du produit "X₁", de loin la plus complète ; l'étude du composé "X₂", assez peu étendue du fait des faibles quantités obtenues, fera l'objet d'une deuxième partie. Nous terminerons par l'exposé de la recherche de la forme naturelle du composé "X", qui s'est révélé provenir d'un composé que nous avons appelé "Pro-X", modifié par l'hydrolyse acide.

II - 2. 3. 1. 1. Etude du produit "X₁"

"X₁" constitue les 4/5 de "X" ; il donne en chromatographie dans l'acide acétique à 60% une tache de R_f = 0,72, demeurant noire en U.V. par addition de réactif de Bénédict. Après purifications chromatographiques, "X₁" cristallise assez facilement dans le méthanol additionné de quelques gouttes d'eau.

De l'examen de son comportement chromatographique (voir tableau en II - 2. 3. 2), il ressort qu'il possède un caractère de lipophilie marqué, mais qu'il peut également migrer relativement loin dans les solvants aqueux.

Son spectre U.V. ($\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{max}} = 256, \sim 268, 346 \text{ nm}$) est celui d'une lutéoline substituée en position 7 ($\Delta\lambda_{\text{II}} = 0 \text{ nm}$ avec NaOAc) ; un déplacement avec l'acide borique est noté ($\Delta\lambda_{\text{I}} = + 19 \text{ nm}$), qui semble indiquer l'existence de deux hydroxyles libres en position 3' et 4'. Un hydroxyle libre en position 5 est décelé par le déplacement ($\Delta\lambda_{\text{I}} = + 32 \text{ nm}$) par AlCl₃ + HCl (AlCl₃ seul donne $\Delta\lambda_{\text{I}} = + 69 \text{ nm}$, ce qui est également en faveur d'une orthodihydroxy-substitution en 3' et 4').

Un phénomène curieux ressort de l'examen du spectre après addition d'acétate de sodium, car, si la bande II reste inchangée, nous avons par contre remarqué, au cours du temps, une modification importante de la bande I. Cette dernière se dédouble en deux bandes à 355 et 398 nm, et au cours du temps, la bande à 398 nm, d'abord simple inflexion, augmente d'intensité au détriment de la bande à 355 nm. Un tel phénomène pourrait correspondre à un blocage labile de l'hydroxyle en 4', interprétation cependant controuvée par les effets borate et chlorure d'aluminium.

L'hydrolyse directe de "X₁" ne libère pas de lutéoline, et pas de sucre (glucose par exemple), fait à priori surprenant de la part d'une lutéoline O-substituée en position 7 (à moins qu'il ne s'agisse d'une glucuronyl-flavone plus résistante au traitement acide (37)). En fait nous sommes arrivés à libérer la lutéoline (mais aucun sucre) à condition de faire subir à "X₁" d'abord une saponification puis une hydrolyse ; ces deux opérations successives libèrent bien la lutéoline.

En relation avec cette nécessité d'un traitement alcalin préalable, notons, dans le spectre I.R., à côté d'une bande à 1650 cm⁻¹ attribuée au carbonyle en 4 de la flavone, une autre bande C=O à 1725 cm⁻¹ qui correspond sans doute à une fonction ester.

Le spectre de RMN du triméthylsilyl-éther de "X₁" se divise en trois groupes de signaux (voir en II - 2. 3. 2)

- de δ 8 à 6 ppm, une zone de protons aromatiques dans laquelle résonent les protons de l'aglycone flavonique.

Par comparaison avec le spectre du TMS-éther de la lutéoline (Mabry, p.286 spectre n° 13), il semble bien que là encore l'aglycone puisse être reconnu, en tout cas quant à son noyau B ; on peut y retrouver en effet dans un massif centré à 7,5 ppm les signaux (J_{ortho} = 9 Hertz) correspondant à H-6', et à 7,4 ppm un signal (J_{méto} = 2 Hz) correspondant à H-2', tandis que H-5' donne un doublet (J_{ortho} = 8 Hz) centré à 6,95 ppm (Mabry, p. 265-266).

L'interprétation de la substitution du noyau A est plus sujette à caution. Si l'on reconnaît bien à 6,43 ppm un doublet (J_{méto} = 2 Hz) situé dans la zone de résonance d'un H-6, le signal correspondant à H-8 se trouve en partie masqué par un important singulet. Une amorce de pic sur le flanc de ce singulet laisse cependant penser qu'il y a interférence à ce niveau entre un doublet (J = 2 Hz) correspondant à H-8 et un singulet correspondant à H-3 (*).

(*) A noter également dans cette zone un doublet de faible intensité vers 7,2 ppm que nous n'avons pu interpréter.

- le deuxième groupe de signaux, situés de 3,5 à 5,5 ppm, peut correspondre à des protons de sucres, hypothèse appuyée également par l'existence d'un doublet ($J = 7$ Hz) à 5,11 ppm, tout à fait analogue à celui obtenu pour les "H-1" des β -glucosides des flavonoïdes (Mabry, p. 268 - 271).

Les autres protons résonent de 3,6 à 4,2 ppm, en un massif complexe, et sont au nombre de 6.

Le spectre de RMN est donc en faveur d'une glycosyl-lutéoline, hypothèse que nous n'avons pu toutefois étayer davantage, comme nous le verrons ci-après.

- enfin la troisième zone présente des signaux correspondant à une quinzaine de protons, de caractère aliphatique, dont la répartition pourrait correspondre à deux groupements méthyle en bout de chaîne (0,85 ppm) et à 4 groupements méthylène (1,25 ppm).

Après examen de ce spectre de RMN, et compte-tenu des informations fournies par les spectres U.V. et I.R., il semble que l'hypothèse la plus probable soit celle d'une glycosyl-7 lutéoline, substituée sur la partie "sucre" (ou en 4' ?) par une chaîne grasse dont la liaison doit être de type ester. L'absence en RMN de signal correspondant à un proton situé en α d'un carbonyle (δ compris entre 2 et 3 ppm) laisse à penser que la fraction acide est située sur la partie "principale" de la molécule (aglycone ou "sucre" qui, dans ce cas, pourrait être un acide uronique), et que le substituant est de nature alcoolique.

Sur ces bases, examinons le spectre de masse de " X_1 ". Le pic de plus haute masse est situé à m/e 532, dont la mesure à haute résolution correspond à la formule brute :

$C_{26}H_{28}O_{12}$; un pic à m/e 286, de formule brute $C_{15}H_{10}O_6$, est, là encore, en faveur d'un aglycone lutéoline, dont nous retrouvons bien, d'après le schéma d'Audier, l'ion "A" à m/e 153 correspondant au noyau "A" de la flavone, et l'ion "B", de formule brute $C_8H_6O_2$, correspondant au noyau "B" d'une flavone orthodihydroxylée.

L'ion $A + CH_2$ (m/e 165), classiquement obtenu par dégradation d'un dihydroxy-5,7 C-glycosyl-flavone, n'apparaît pas dans ce spectre ; ceci est en accord avec les résultats obtenus en RMN, qui plaident en faveur de la présence de deux hydrogènes en positions 6 et 8.

Parmi les autres pics obtenus, certaines mesures de masse à haute résolution ont permis de montrer que m/e 514 provient d'un départ de H_2O , que le pic 500 ($C_{25}H_{24}O_{11}$) correspond à $532 - CH_3OH$, tandis que l'ion 342, du fait de sa faible teneur en hydrogène par rapport à sa forte proportion d'oxygène, permet d'envisager un départ de la chaîne grasse et une coupure du noyau flavonique, le fragment aromatique restant lié à une fraction osidique plus ou moins dégradée.

Un énorme pic m/e 300, de formule $C_{16}H_{12}O_6$, ne peut correspondre qu'à $C_{15}H_{10}O_6$ (lutéoline) + CH_2 . Quelle est l'origine de ce pic, qui ferait bien sûr penser aux pics "A" et "A'" notés par Prox dans la dégradation des C-glucosyl-flavones, si nous n'avions écarté précédemment cette hypothèse (*). Il ne nous a pas été possible de l'expliquer, à moins d'admettre un type de O-glycosylation tout à fait particulier, dans lequel la fragmentation, au lieu d'affecter directement la liaison osidique comme dans le cas d'une O-glycosyl-flavone classique, dégraderait partiellement l'ose, en laissant un fragment lié à la partie aromatique. De même, l'ion 342 résulterait d'une fragmentation de l'hétérocycle flavonique préalable à l'élimination de tout ou partie de l'ose lié, qui est donc fortement lié, (cf. l'absence de sucre à l'hydrolyse).

Dans l'espoir de tirer davantage de renseignements des spectres de masse et de RMN, il aurait été bon de disposer du spectre de masse d'une glucuronylflavone de référence ; mais les échantillons en notre possession n'étaient pas d'une qualité suffisante pour permettre de tels enregistrements.

En conclusion, la lutéoline constitue bien le squelette flavonique de " X_1 ", mais les substituants qu'elle porte sont encore loin d'être identifiés et nécessitent d'autres travaux (en cours).

Revenons maintenant un peu sur les résultats concernant " X_2 ", deuxième constituant de la tache X de la phase butanolique d'hydrolyse.

(*) D'ailleurs, chez ces composés, le pic impair est toujours le plus intense, alors qu'ici le pic 299 est très faible par rapport au pic 300.

II - 2.3.1.2. Etude du produit "X₂"

Le comportement chromatographique de "X₂" est tout à fait analogue à celui de "X₁" dont il se sépare plus ou moins nettement suivant les solvants (voir tableau en II - 2.3.2.). C'est l'utilisation du réactif de Bénédict - comme nous l'avons déjà indiqué - qui nous a permis de mettre ce composé en évidence dans la longue tache de fluorescence brun-violet appelée "X" en chromatographie bidimensionnelle : rappelons que "X₁" se révèle en noir à 350 nm tandis que "X₂" apparaît jaune-vert après vaporisation du réactif.

Bien qu'il n'y ait pas, ici aussi, d'hydroxyle libre en position 7 ($\Delta\lambda_{\text{II}} = 0$ en présence d'acétate de sodium), le spectre U.V. de "X₂" diffère un peu de celui de "X₁" ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 251, 268, 349 \text{ nm}$) et laisse supposer qu'il pourrait s'agir d'un dérivé du chrysoériol, puisqu'aucun déplacement de la bande I n'est observé en milieu borate.

Cette hypothèse est appuyée également par le comportement avec le réactif de Bénédict, et par l'analogie avec le cas de l'homoorientine et de l'isoscoparine.

Le spectre I.R.₁ de "X₂" ressemble étrangement à celui de "X₁". On y retrouve à côté d'une bande vers 1660 cm⁻¹ qui doit être attribuée ici aussi au carbonyle en 4 de la flavone, une bande à 1725 cm⁻¹ qui correspond sans doute aussi à un groupement ester. La bande située vers 1250 cm⁻¹ existe dans ce spectre comme dans celui de "X₁"; par contre, la bande très intense et très fine à 1375 cm⁻¹ est due à une impureté.

La quantité de cristaux de "X₂" obtenus en milieu méthanolique étant très faible, nous n'avons pu obtenir comme autres données physiques que le spectre de masse.

Ce spectre de masse (voir II - 2.3.2.) apporte peu de données nouvelles :

- des pics faibles apparaissent à des masses assez élevées : m/e 662, 635, 603... 577.... 532 (le même que dans "X₁", mais faible), 523, 514, 495... En fait, dans ces hautes masses, l'ion le plus intense étant à m/e 577, masse impaire, ne peut être l'ion moléculaire.
- le pic m/e 300 est le plus intense : il pourrait être attribué à la flavone chrysoériol ; il est accompagné du pic 301.
- on trouve aussi m/e 313 : aglycone + CH₂ ? Mais ici 313 est beaucoup plus faible que 300.
- la présence d'un pic m/e 286 doit-elle être attribuée à un manque de pureté de "X₂" (qui contiendrait un peu de "X₁") ou à une déméthylation du chrysoériol ?
- si l'on admet que l'aglycone est le chrysoériol, ceci peut expliquer la présence du pic m/e 148, correspondant au noyau B de la flavone (monohydroxylée et monométhoxylée ; de même cela s'accorderait avec la présence du pic m/e 153, correspondant à l'ion "A" d'Audier (noyau A de la flavone).

Tout ceci pourrait laisser supposer pour "X₂" une structure chrysoériol, substitué en 7 par un groupement relativement volumineux.

II - 2.3.1.3. Etat naturel de "X"

"X" ayant été obtenu après hydrolyse acide et l'étude de ses deux constituants "X₁" et "X₂" s'étant révélée très complexe, nous avons recherché son état naturel dans Potamogeton natans ; pour cela nous avons travaillé sur le "décocté" obtenu à partir de feuilles dégraissées.

C'est dans les fractions H et I de fin d'élution de la colonne de polyamide par le méthanol RP que nous avons obtenu un flavonoïde majeur, purifié par passage dans BAW 27% (R_f = 0.61) ; il cristallise dans le méthanol aqueux. Soumis à une hydrolyse acide de 45 mn., dans HCl 2N, ce produit libère "X", identifié par cochromatographies. Donc "Pro-X" est bien un prédecesseur de "X".

Du point de vue révélation chromatographique, la substance se comporte tout à fait comme "X", c'est à dire sous forme d'une large tache noire avec un mince ourlet jaune-vert à la partie supérieure, en présence de réactif de Bénédict.

Le spectre U.V. ($\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 256, 269, 284, 344 \text{ nm}$) est encore du "type" lutéoline, avec l'hydroxyle en position 7 bloqué ($\Delta\lambda_{\text{II}} = 0$ en présence d'acétate de sodium) ; on

observe aussi, comme dans le cas de "X₁", un déplacement progressif de la bande I en présence d'acétate en fonction du temps. L'effet borate ($\Delta\lambda_1 = + 18$ nm) tend à prouver qu'on est en présence d'une flavone orthodihydroxylée en 3' et 4'.

Le phénomène le plus étrange est l'étroite ressemblance du spectre I.R. de ce composé avec ceux des "X". On y retrouve en effet la bande C=O de la flavone vers 1650 cm^{-1} et la bande ester vers 1725 cm^{-1} . La plus grande différence entre les deux spectres est dans la zone $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ (zone des liaisons C-OH alcooliques, comme dans les sucres).

L'interprétation du spectre de masse est assez sommaire :

- le pic de plus haute masse, m/e 489, masse impaire, n'est sans doute pas l'ion moléculaire (il ne figure pas dans le spectre de "X₁");
- les pics m/e 286 et m/e 300 saturent le spectre par leur trop forte intensité. 286 correspond-il à la lutéoline et 300 à lutéoline + CH₂ ? (ou bien ce dernier est-il accentué par le fait que le produit n'est pas très pur et contient un peu de "Pro- X₂" ?)
- les autres pics intenses sont à :
 - m/e 258 (décarboxylation de la lutéoline ?) ;
 - m/e 153 et m/e 134, de même que m/e 129 proviennent sans doute encore ici de la dégradation de la flavone en 2 parties correspondant aux noyaux A et B.

En conclusion, non seulement nous ne connaissons pas la structure du produit "X", mais en essayant d'aborder différemment le problème par l'étude des composés naturels, nous n'avons pas encore pu préciser nettement l'origine de "X", ce que nous avons appelé "Pro-X" n'étant peut-être pas lui-même le véritable prédécesseur de "X", mais seulement un intermédiaire. En effet ce "Pro-X" n'existe pas sur la chromatographie bi-dimensionnelle initiale du "décocté" non hydrolysé. Sur celle-ci existent deux taches très proches l'une de l'autre, révélées respectivement l'une en noire, l'autre en jaune-vert, et non identifiées ; c'est peut être bien de là que provient ce que nous appelons "Pro-X" (sans doute modifié par le passage sur colonne de polyamide), à tort si ces deux taches en sont l'origine. Leurs positions respectives sont R_f = 0,36 et R_f = 0,40 dans BAW 27% ; R_f = 0,20 dans l'acide acétique 15%.

II - 2. 3. 2. Partie expérimentale

II - 2. 3. 2. 1. Données concernant "X₁"

a) Comportement chromatographique :

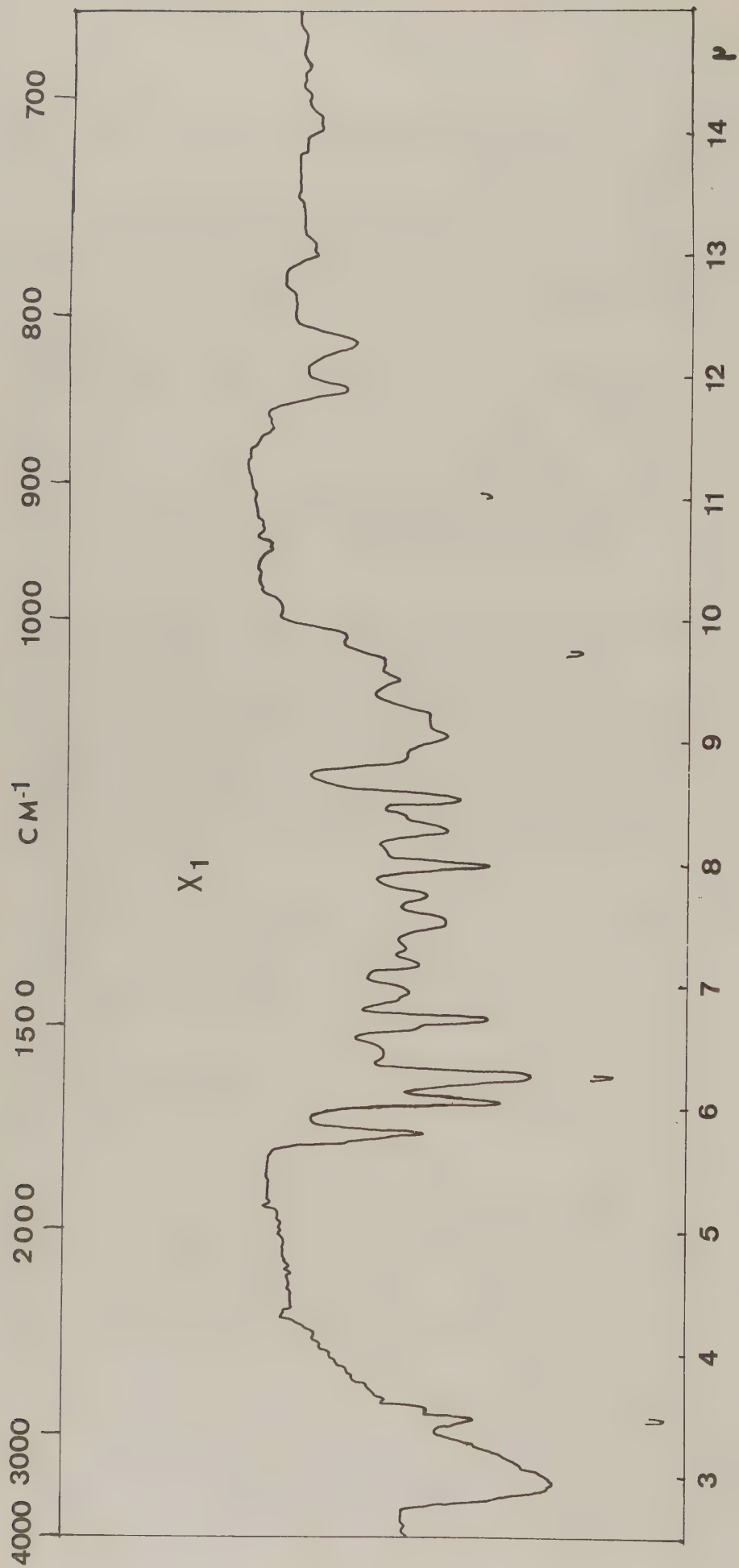
R_f = 0,80 / BAW 27% ;
 0,72 / AcOH 60% ;
 0,22 / AcOH 15% ;
 0,88 / AcOEt-HCOOH-Eau (30-10-3).

b) Spectre U.V. :

Méthanol RP : 256, 268, 346 nm (349 nm dans EtOH).
 Acétate de Na: (t=O) 257, 267, 355, 394 nm
 (t=5') 258, 268, 354, 398 nm $\Delta\lambda_{II} = \pm 0$ et $\Delta\lambda_I = + 42$ nm.
 Acide borique : 257, 365 nm $\Delta\lambda_I = + 19$ nm.
 AlCl₃ neutre : 272, 297, 353, 415 nm. $\Delta\lambda_I = + 69$ nm.
 AlCl₃ + HCl : 269, 295, 353, 383 nm. $\Delta\lambda_I = + 37$ nm.

c) Spectre I.R. :(voir p. 56.)

Obtenu par pastillage dans KBr. -1
 Bandes principales : $\nu = 1725\text{ cm}^{-1}$
 1650
 1600
 1250



d) Spectre de RMN : (voir p. 58).

Le spectre de " X_1 " triméthylsilylé, en solution dans $CDCl_3$, a été enregistré sur un appareil Varian, type A-60A, la référence interne étant le tétraméthylsilane (TMS) (*). Les valeurs des déplacements chimiques sont données en valeurs δ (ppm = partie par million) par rapport au TMS, et les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz.

Correction faite pour les mesures de δ de 0,02 ppm, nous avons :

- une première zone, de $\delta=8$ à $\delta=6$ ppm, correspondant aux protons aromatiques, dans laquelle résonent les protons de l'aglycone flavonique ;
- une deuxième zone, de $\delta=5,5$ à $\delta=3,5$ ppm environ, où les signaux peuvent être dus à des protons de sucre ;
- une troisième zone, enfin de $\delta=2$ à $\delta=0,5$ ppm environ, correspondant à des protons aliphatiques, laissant présager l'existence d'une chaîne grasse.

e) Spectre de masse (**): (voir p. 60).

Nous reproduisons ci-dessous les pics obtenus, en indiquant entre parenthèses les intensités relatives et en marquant d'un signe les pics mesurés à haute résolution :

$$532 \text{ (25\%)} = 532, 157659 - 1 \text{ ppm} = C_{26}H_{28}O_{12} \text{ (***)}$$

$$514 \text{ (32\%)} = 514, 146931 - 1 \text{ ppm} = C_{26}H_{26}O_{11}$$

$$500 \text{ (7\%)} = 500, 128580 - 6 \text{ ppm} = C_{25}H_{24}O_{11}$$

458 (6%)

413 (3%)

406 (3%)

380 (5%)

353 (5%) et 366 (5%)

$$342 \text{ (23\%)} = 342, 057828 - 3 \text{ ppm} = C_{14}H_{14}O_{10}$$

325 (11%)

313 (23%)

$$300 \text{ (100\%)} = 300, 063049 - 1 \text{ ppm} = C_{16}H_{12}O_6 = \text{Lutéoline} + CH_2$$

299 (54%)

$$286 \text{ (100\%)} = 286, 047731 + 9 \text{ ppm} = C_{15}H_{10}O_6 = \text{Lutéoline}$$

287 (93%)

271 (52%) et 272 (37%)

$$258 \text{ (73\%)} = \text{Lutéoline} - (C=O) = \text{Lutéoline} - 28$$

257 (69%)

229 (73%)

214 (14%) et 213 (9%)

201 (9%) et 200 (9%)

197 (11%)

184 (9%) et 186 (9%)

171 (12%)

153 (82%)

152 (68%)

$$134 \text{ (68\%)} = 134, 037312 + 4 \text{ ppm} = C_8H_6O_2 = \text{noyau B de la flavone}$$

129 (59%)

124 (68%)

114,5 (52%) = 229/2

105 (59%)

95 (67%) et 96 (52%)

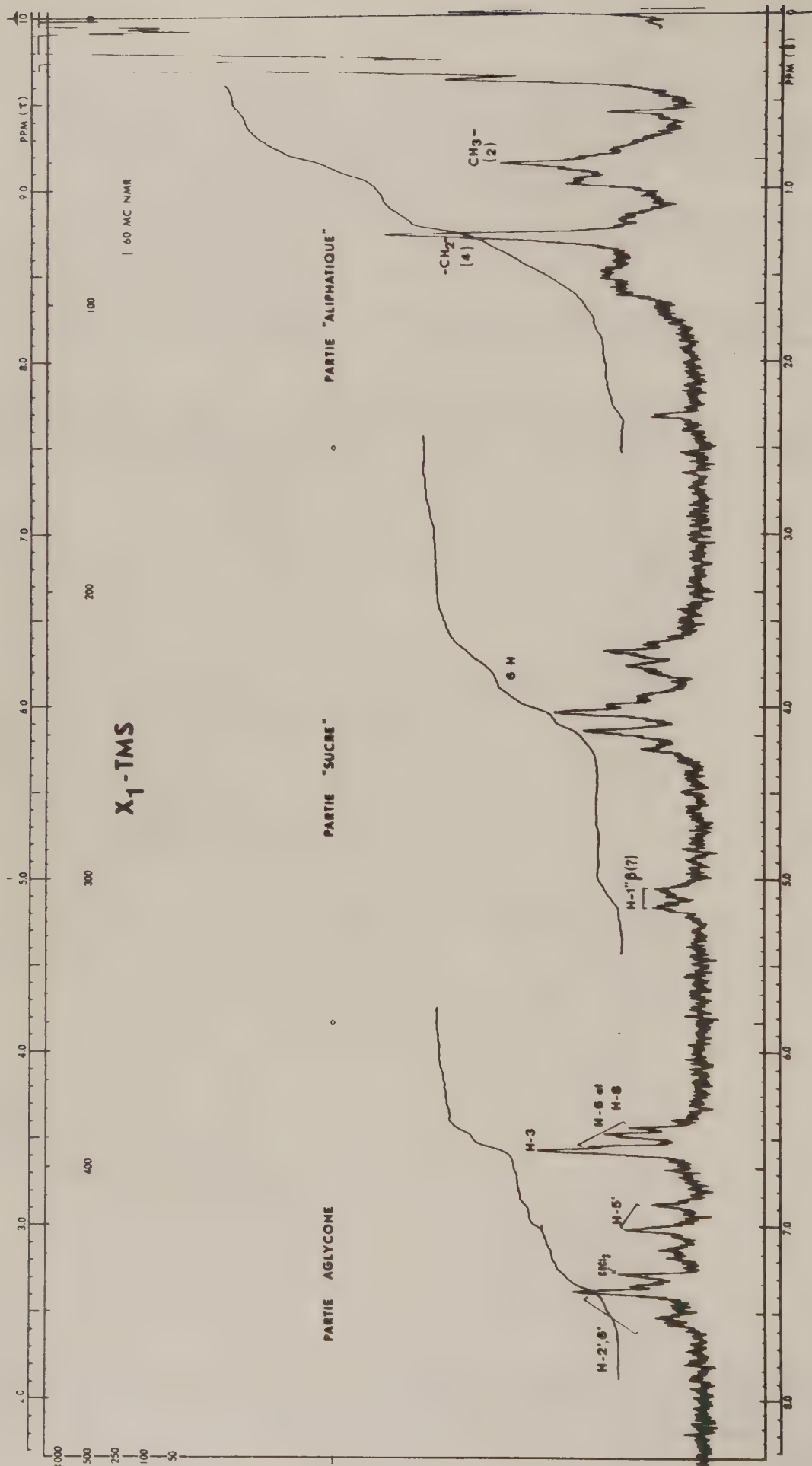
83 (36%)

69 (69%)

(*) Le spectre de Résonance Magnétique Nucléaire réalisé dans le Laboratoire du Professeur Delmau, a été enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre VARIAN A 60.

(**) Le spectre de masse a été enregistré au Laboratoire de Chimie Analytique de l'UER de Pharmacie de Lyon.

(***) Aucune formule contenant de l'azote n'est compatible avec les masses mesurées à haute résolution.



56 (100%) saturé

Il est possible de calculer le nombre de cycles et (ou) de doubles liaisons dans le composé $C_{26}H_{28}O_{12}$ ($M = 532$), compte-tenu de la valence de chacun des éléments. Pour cela, nous utilisons la formule suivante :

Nombre de cycles et (ou) de doubles liaisons = $x - 1/2 y + 1/2 z + 1$, où les lettres sont affectées

à chaque élément comme suit : $C_x H_y N_z O_n$ (34) ; il vient :

$$N = 26 - 28/2 + 1 = 27 - 14 \\ = 13 \text{ cycles et doubles liaisons.}$$

L'aglycone étant la lutéoline, qui comporte 8 doubles liaisons et 3 cycles, il reste 2 cycles et (ou) doubles liaisons pour le "complément" 246 (532-286). On peut songer au cycle d'un "sucre" et à la double liaison de la fonction ester.

f) Microanalyse :

Le Service de Microanalyse (Ecole de Chimie de Lyon) nous a communiqué les résultats obtenus sur un échantillon de "X₁" :

C = 54,69% et 54,64%

H = 5,19% et 5,16%

N = absence ou traces.

Le dosage de l'oxygène n'a pu être effectué par manque de matière première. Ces résultats sont en accord partiel avec ceux de la spectrométrie de masse, qui nous a appris qu'aucune formule contenant de l'azote n'était compatible avec les masses mesurées à haute résolution. Par contre, les résultats sont en contradiction avec la formule $C_{26}H_{28}O_{12}$ qui implique C = 58,64% et H =

5,30%, écart non admissible pour le carbone. Mais nous ne pouvons dire s'il s'agit d'une impureté (dosée par les mesures chimiques mais non mesurée à la masse), ni si 532 est la véritable masse molaire. A ce propos en adoptant un coefficient d'absorption molaire égal à 20.000 (l'aglycone absorbant seul), une mesure de densité optique sur une solution de "X₁" à 1 mg/50 cm³ nous conduit à une masse moléculaire de 580 (± 10%).

g) Saponification puis hydrolyse acide :

. Mode opératoire :

12 mg de "X₁" (*) sont dissous dans 3 cm³ méthanol RP et additionnés de 3 cm³ de potasse méthanolique (0,36 N) ; la réaction de saponification, selon la technique d'A. Grouiller (35), se poursuit 1/2 heure à température ambiante (20°C) sous courant d'azote.

Aussitôt après, le mélange réactionnel orange est évaporé à sec sous vide vers 50°, et repris par 2,5 cm³ d'éthanol à 95°, puis additionné de 3,5 cm³ HCl 2N.

6 cm³ de solution chlorhydrique hydroalcoolique sont donc soumis à l'hydrolyse acide à 100° au bain-marie pendant 6 heures en tube scellé (38).

Remarque : 3,5 cm³ HCl 2N ont été nécessaires, au lieu de 2,5 cm³, car il fallait tout d'abord neutraliser KOH et ajouter HCl qsp pour une solution d'hydrolyse N.

Après refroidissement :

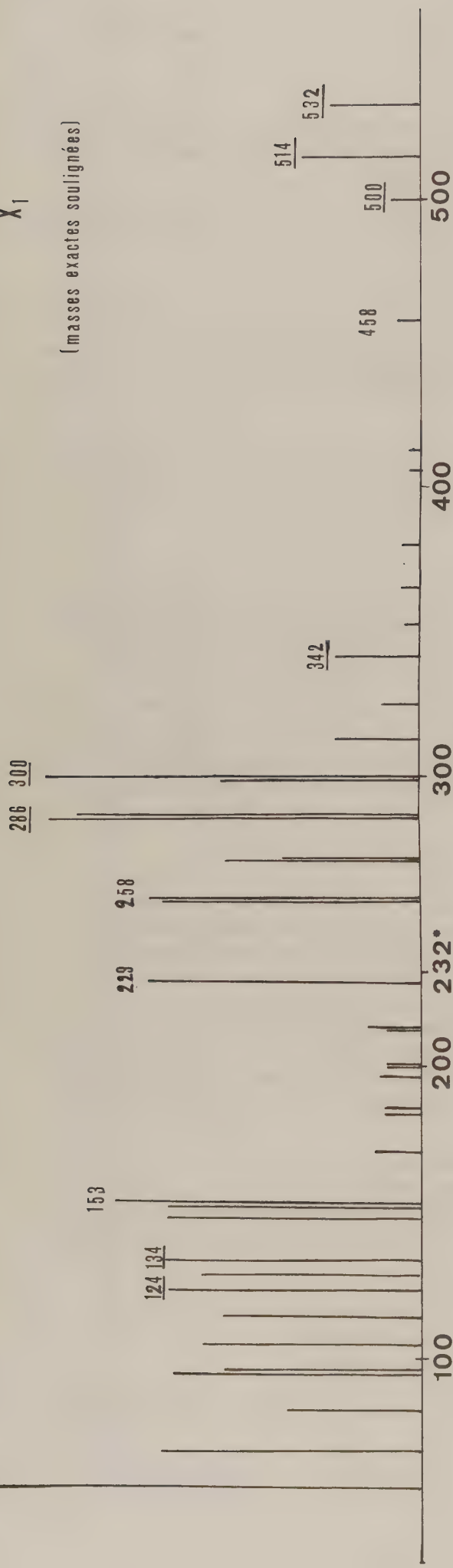
- extraction à l'éther...1 solution jaune foncé = phase éther ;
- extraction au n-butanol:solution jaune orangé = phase butanol ;
- reste la phase aqueuse pratiquement incolore (KCl qu'elle renferme est éliminé par passage sur colonne d'Amberlite IRC 50) ; après évaporation à sec, elle est reprise dans très peu d'eau pour les dépôts chromatographiques.

. Résultats :

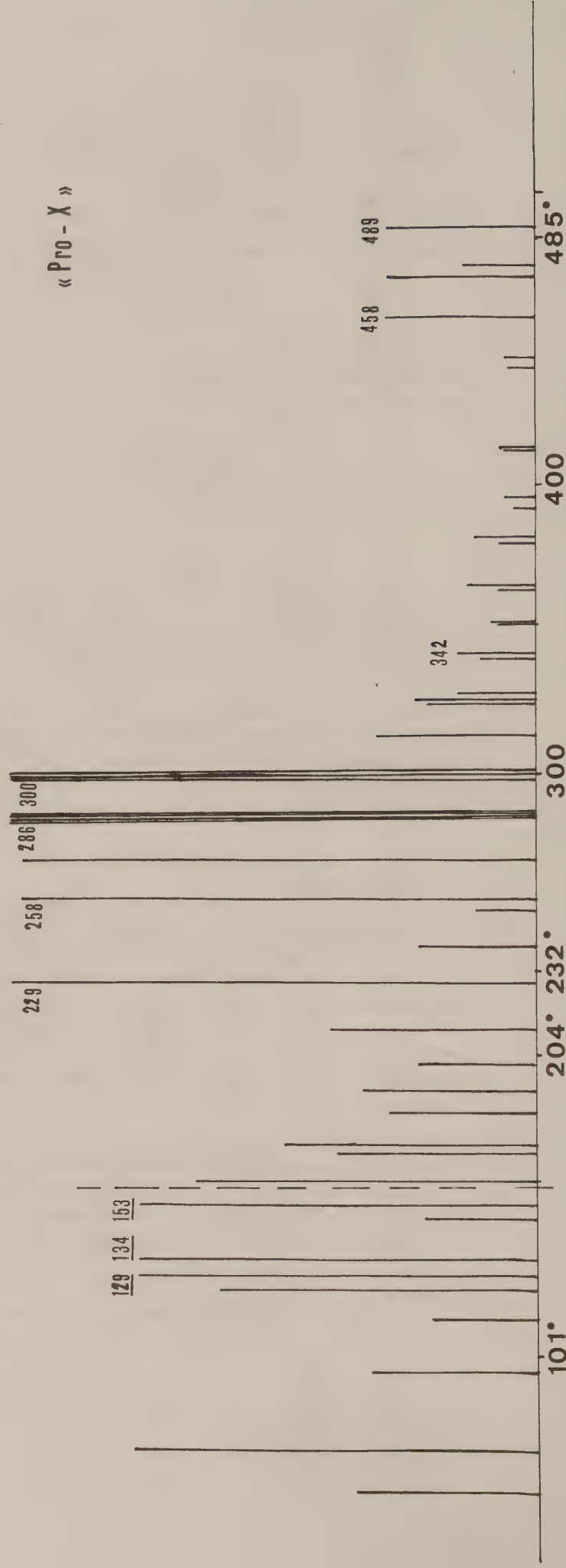
- Acide acétique 60% : phase éther..... 2 taches brun-violet :
 - +++ 1 : R_f = 0,51 ; noire au Bénédict.
 - + 2 : R_f = 0,66 ; noire au Bénédict.

X_1

(masses exactes soulignées)



« Pro - X »



phase butanol.... 2 taches brun-violet :

++ 1' Rf = 0,54 ; noire au Bénédict.

(+) 2' Rf = 0,56 ; noire au Bénédict.

témoins : lutéoline (Rf = 0,52) : "X₁" (Rf = 0,71).

- BAW 415 : phase éther..... 3 taches brun-violet :

+ I Rf = 0,38 ; noire au Bénédict en U.V.

+ II Rf = 0,66 ; noire au Bénédict en U.V.

+++ III Rf = 0,83 ; noire au Bénédict en U.V.

phase butanol..... 2 taches brun-violet :

I' Rf = 0,39 ; noire au Bénédict en U.V.

II' Rf = 0,66 ; noire au Bénédict en U.V.

témoin : lutéoline (Rf = 0,84) ; noire au Bénédict en U.V.

"X₁" (Rf = 0,80) ; noire au Bénédict en U.V.

phase aqueuse..... 1 tache translucide sur papier mouillé (Rf = 0,09),
due peut-être à des sels résiduels.

. Conclusions :

- Phase éther.

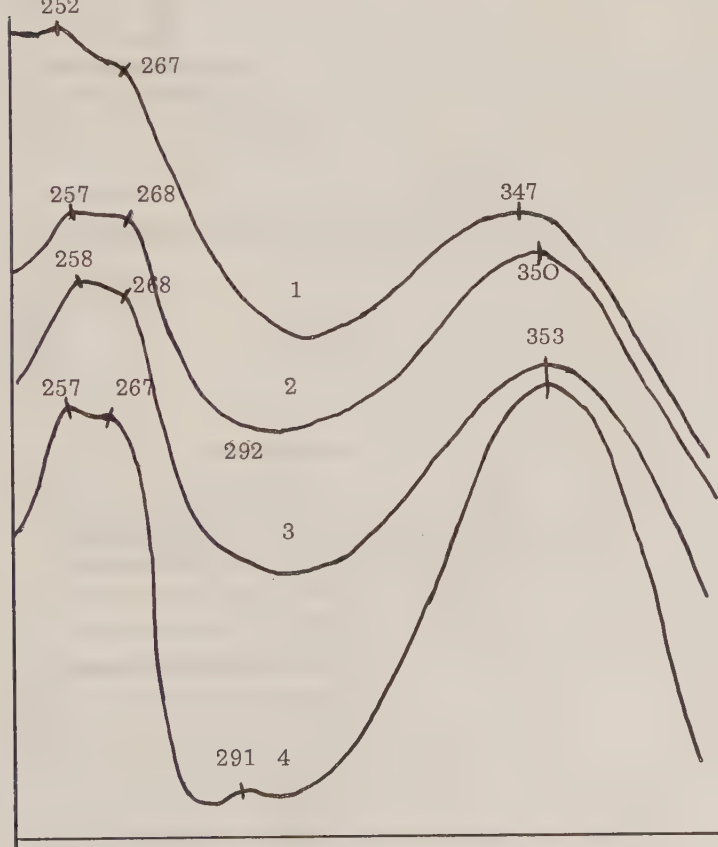
Le principal aglycone résultant de ces deux traitements successifs est la tache de Rf = 0,51 = 1 de l'acide acétique 60% ;

Rf = 0,83 = III de BAW 415.

La tache 1 de l'acide acétique 60%, rechromatographiée sur gel de silice Merck dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique, en présence aussi de la phase éther globale, se révèle identique à la lutéoline témoin (Rf = 0,26). Le spectre U.V. de la bande "0,51" = 1 est identique aussi à celui de la lutéoline.

Le deuxième "aglycone" de la phase éther : 2 (Rf = 0,66) a aussi un spectre U.V. de type lutéoline. Nous ne pouvons affirmer que ce produit soit identique au produit principal de la saponification (autrement dit, en supposant que celui-là soit la glucuronyl-7 lutéoline, 6 heures d'hydrolyse en tube scellé ne suffisent pas pour hydrolyser complètement).

- Phase butanol.



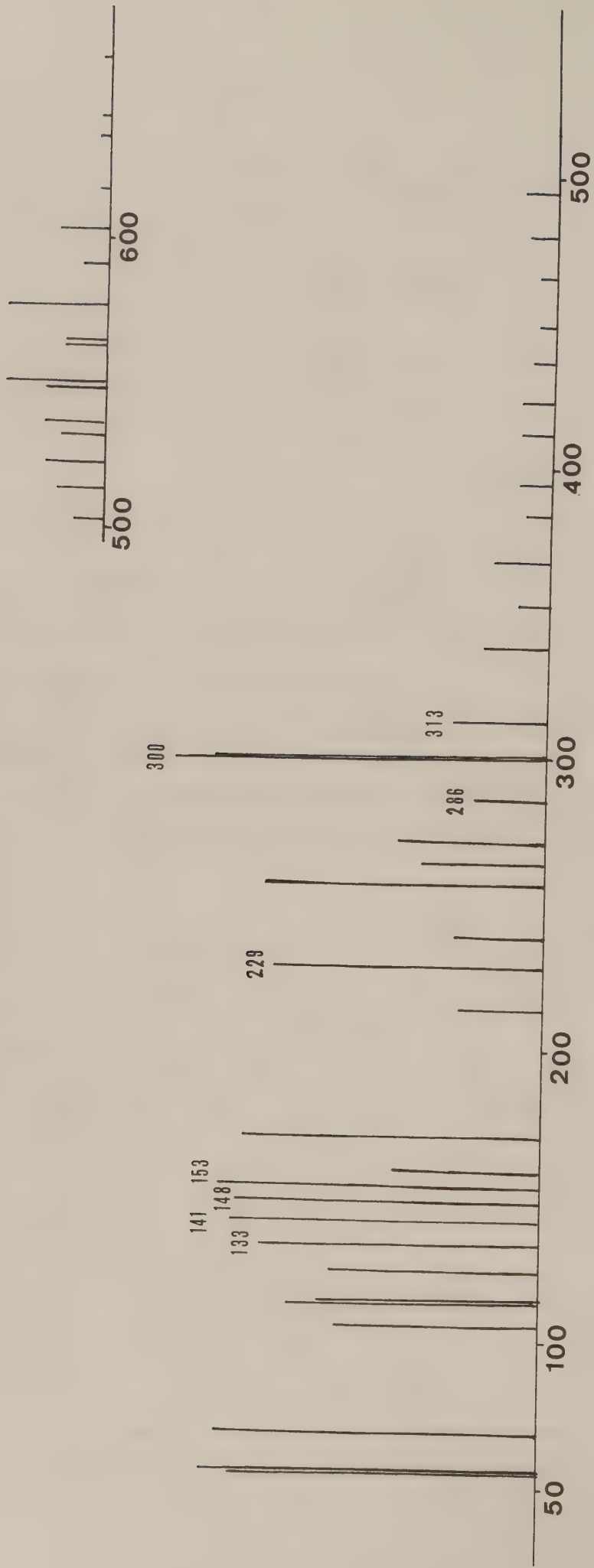
1 = bd 0,66 (BuOH ds BAW) 3 = bd 0,66 (Ether ds AcOH 60%)
2 = bd 0,39 4 = bd 0,52

Elle est réparti, comme nous venons de le dire, en 2 composés dans le BAW 415, le principal étant à Rf = 0,39 (36,37). Le deuxième produit de la phase butanol (Rf = 0,66 = II' = aussi II de la phase éther) à un spectre du type lutéoline ; mais il n'a pas été étudié plus profondément.

Avant de terminer cet exposé, nous avons comparé les spectres U.V. alcooliques des différents produits (à l'exclusion de la lutéoline) issus de ce dernier traitement chimique en les traçant les uns au-dessous des autres nous constatons :

- un déplacement bathochrome du (λ_{max}) de la bande I en passant du spectre n°1 au n°4 ;
- l'absence d'inflexion vers 290 nm dans les spectres 1 et 3 ;
- enfin l'allure différente de la bande II du spectre n°1 par rapport aux 3 autres (mais il peut s'agir d'une impureté dans l'U.V. lointain).

X₂



- Phase aqueuse.

Celle-ci avait retenu tout particulièrement notre attention, car nous comptons y mettre en évidence :

- . soit la présence d'un sucre (fixé à l'aglycone) et d'un acide libéré par la saponification ;
- . soit l'inverse, c'est à dire la présence d'un acide uronique (fixé à la lutéoline) finalement libéré par les 6 heures d'hydrolyse en tube scellé, et d'un alcool gras.

Nous avons déjà parlé plus haut de la présence d'une tache ronde, translucide sur papier imbibé de BAW. L'élution de celle-ci ne présente aucun spectre U.V. ; peut-être est-elle due à du KCl pas complètement échangé en passant sur la résine.

Nous avons alors essayé de mettre en évidence, dans cette phase aqueuse, soit un acide, soit un sucre :

- mise en évidence d'un acide gras par passage de la phase aqueuse, et aussi de la phase éther, sur gel de silice G dans Hexane-Ether (80-20) et aussi sur gel G dans Hexane-Ether-Acide acétique (70-30-1), suivies d'une révélation à la rhodamine + fluorescéine.

Un témoin d'acide gras méthylé est fluorescent blanc à 350 nm, puis jaune après vaporisation des révélateurs (et rose foncé sur fond rose pâle à la lumière visible).

Donc les phases aqueuse et éther de "X₁" ne contiennent pas d'acide gras, ni même d'alcool qui migrerait pratiquement au front dans ces deux solvants.

II - 2. 3. 2.2 . Données concernant "X₂"

a) Comportement chromatographique :

R_f = 0,85 dans BAW 27% ;

R_f = 0,80 dans l'Acide Acétique à 60% ;

R_f = 0,25 dans l'Acide Acétique à 15% ;

R_f = 0,92 dans Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (30-10-3).

b) Spectres U.V. :

Ethanol à 95° : 251, 268, 349 nm.

Acétate de Na : 251, 268, 349 nm.

Acide borique : 251, 268, 349 nm.

$$\begin{array}{l} \Delta\lambda_{\text{I}} = 0 \\ \Delta\lambda_{\text{II}} = 0 \end{array}$$

c) Spectre de masse :

Nous avons relevé les pics les plus intenses du spectre représenté page ci-contre, en notant entre parenthèses leurs intensités relatives :

603 (12%)

577 (26%)

551 (26%)

537 (15%) et 532 (12%)

523 (15%)

.....

368 (14%)

339 (17%)

313 (25%) = Aglycone + CH₂ ?

300 (100%) = Aglycone chrysoériol ?

301 (89%)

286 (19%) = Chrysoériol déméthylé ?

272 (39%)

257 (75%)

229 (72%)

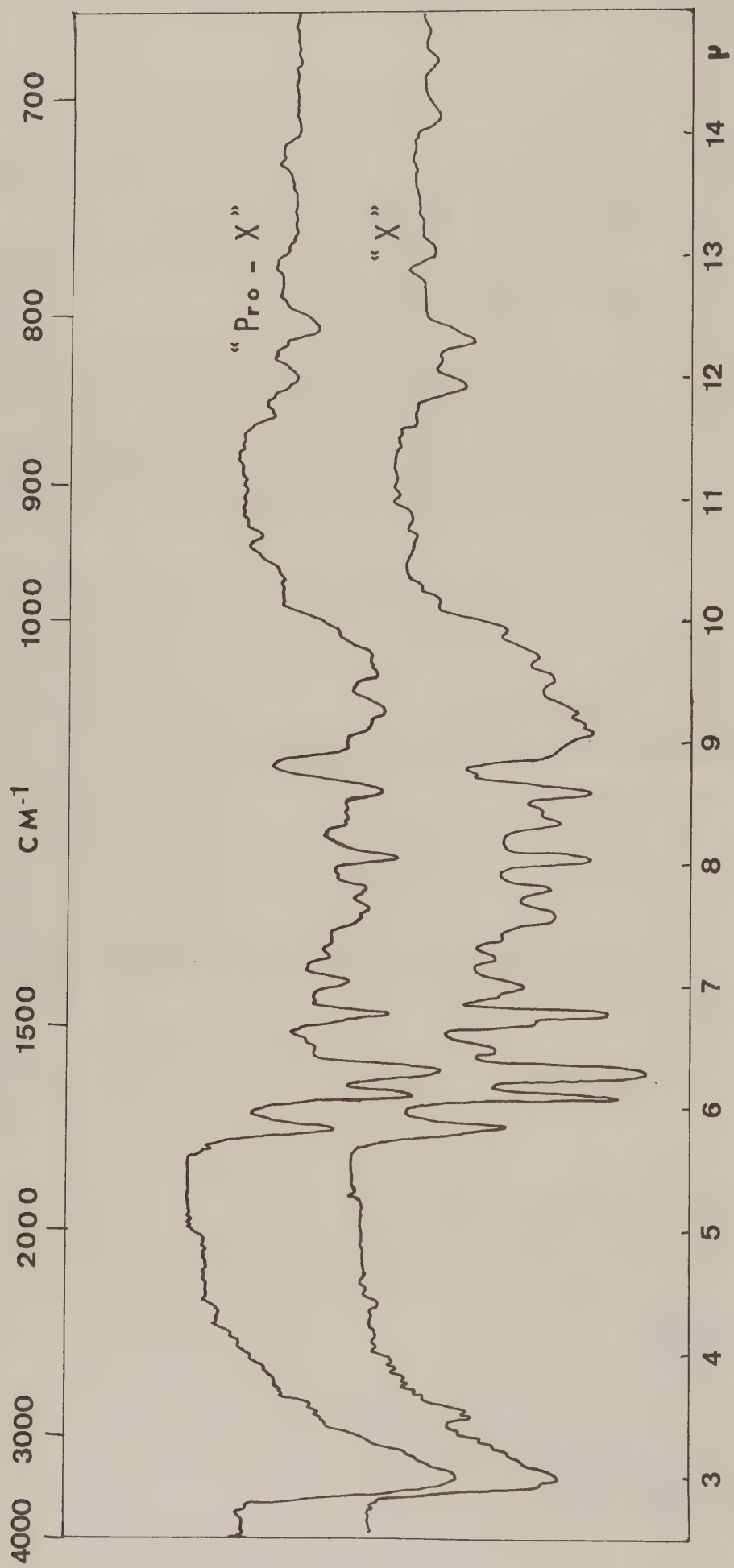
170 (80%)

153 (86%) = Noyau A de la flavone.

148 (81%) = Noyau B de la flavone.

141 (83%)

133 (75%)



124 (56%)
 114,5 (59%) = 229/2, et 113 (43)
 105 (55%)
 69 (86%)
 56 (91%) et 55 (83%).

II - 2. 3. 2. 2. Données concernant "Pro-X"

La colonne de polyamide du "décocté" de Potamogeton natans non hydrolysé a fourni deux fractions H et I en fin d'élution avec le méthanol RP. Celles-ci ont été purifiées par passage sur papier dans BAW 27%, et le flavonoïde majeur isolé ($R_f = 0,61$) a cristallisé, ce qui nous a permis d'enregistrer un spectre I.R. très proche de celui de "X₁" avec, entre autres, la bande caractéristique à 1725 cm^{-1} attribuée à une fonction ester.

a) Comportement chromatographique :

Le composé de $R_f = 0,61$ dans BAW 415, appelé "Pro-X", présente à 350 nm une fluorescence brun-violet, et devient noir après vaporisation de réactif de Bénédict, avec un petit ourlet jaune à la partie supérieure de la tache.

En chromatographie bidimensionnelle, "Pro-X" se comporte ainsi :

Rf = 0,62 dans BAW 415	}	noir en U.V. au Bénédict.
0,27 dans l'acide acétique 15%		
Rf = 0,62 dans BAW 415	}	jaune-vert au Bénédict.
0,32 dans l'acide acétique 15%.		

Autrement dit, "Pro-X" se comporte chromatographiquement :

- dans l'acide acétique 15%, de la même manière que "X" ;
- dans les BAW, un peu différemment : migrant moins haut que "X", "Pro-X" est moins "lipophile", c'est à dire a un comportement beaucoup plus typique d'un glucoside de manière générale.

b) Comportement spectral U.V. de "Pro-X" :

Ethanol à 95° :	256, 269, 284 (?), 344 nm.	
Acétate de Na (inst.) :	255, 268, 283, 343 nm.	$\Delta\lambda_{II} = \pm 0\text{ nm.}$
(5 mn) :	258, 268, 356, 410 nm.	
Acide borique :	257, 266, 284, 362 nm.	$\Delta\lambda_I = + 18\text{ nm.}$
NaOH :	267, 282, 405 nm.	$\Delta\lambda_I = + 61\text{ nm.}$
AlCl ₃ neutre :	357, 395 nm.	$\Delta\lambda_I = + 51\text{ nm.}$
AlCl ₃ + HCl :	354, 391 nm.	

c) Spectre I.R. .

Il est reproduit page ci-contre, au-dessus du premier spectre I.R. réalisé sur le "mélange" "X".

d) Spectre de masse : (voir p. 60).

Nous reportons les pics les plus nets ; ceux qui existent aussi dans le spectre de "X" sont précédés du signe =. Enfin les intensités relatives des pics sont précisées entre parenthèses.

489 (17%)
 472 (17%) et 476 (13%)
 = 458 (17%)
 444 (6%) et 440 (5%)
 = 413 (7%)
 396 (6%)
 382 (11%) et 380 (7%)
 366 (12%) et 364 (7%)
 = 353 (8%) et 352 (7%)
 = 342 (14%) et 340 (10%)
 326 (22%)

314 (30%)
 = 300 ($\geq 100\%$) et 299 ($\geq 100\%$) et 301 ($\geq 100\%$)
 = 286 ($\geq 100\%$) comme 285, 287 et 288
 271 (98%)
 = 258 (98%) et 255 (11%)
 241 (22%)
 = 229 (100%)
 213 (39%)
 201 (22%)
 192 (32%)
 184 (28%)
 173 (48%) et 170 (38%)
 161 (75%)

= 153 (87%)
 148 (21%)
 = 134 (75%)
 = 129 (75%)
 = 124 (60%)
 114,5 (20%)
 96 (31%)
 = 69 (88%)
 = 55 (35%)

Nombreux sont les pics métastables, de masse :

485^{*}232,5^米

204

101*

e) Hydrolyse de "Pro-X" :

Cette opération, menée 40 mn dans HCl 2N au bain-marie bouillant, est suivie d'une extraction à l'éther, puis au n-butanol.

Phase butanol :

Une chromatographie bidimensionnelle de celle-ci montre 2 groupes de taches

- l'inférieur noir au Bénédict (Rf = 0,60 dans BAW 27% ;
0,18 dans AcOH 15%);
jaune-vert au Bénédict (Rf = 0,80 dans BAW 27% ;
0,18 dans AcOH 15%).

- le supérieur noir au Bénédict ($R_f = 0,80$ dans BAW 27% ;
0,18 dans AcOH 15%);
jaune-vert au Bénédict ($R_f = 0,80$ dans BAW 27% ;
0,22 dans AcOH 15%).

Des résultats très intéressants sont fournis par 3 cochromatographies bidimensionnelles dans BAW 415 puis dans l'acide acétique à 15% :

- "Pro-X" + "Pro-X" hydrolysé (phase butanol) :

on observe deux groupes de taches comme ci-dessus ;

- "Pro-X" hydrolysé (phase butanol) + X_1 :

il apparait seulement le groupe de taches de Rf supérieur dans BAW ;

$$= \text{"Pro-X"} + \text{"X}_1 \text{"}$$

de nouveau les deux groupes de taches.

Phase éther :

Le résidu sec de l'extraction étherée, repris par un peu d'alcool, est chromatographié dans l'acide acétique 60% ; aucun flavonoïde n'apparaît même après révélation. "Pro-X" ne libère donc pas de lutéoline après 40 mn d'hydrolyse à HCl 2N.

Phase aqueuse :

Plusieurs dépôts, après passage dans BAW 415 et en présence de témoins, permettent l'utilisation de divers réactifs signalés par Lederer (39) :

- phtalate d'aniline (+ 5 mn de chauffage à l'étuve à 110°) :

il apparaît 2 taches beige-brun séparées par une trainée de $R_f = 0,14$ (jaune-vert en U.V.) et $R_f = 0,37$ (brun en U.V.) ; l'acide glucuronique témoin donne 2 taches beige-brun de $R_f = 0,23$ et $R_f = 0,39$ (la tache supérieure correspond à la lactone).

- paraanisidine (chlorhydrate à 3% dans le n-butanol) :

ce réactif aminé fait apparaître 2 taches brun pâle dans la phase aqueuse et 2 taches roses (en U.V. comme en visible) pour l'acide glucuronique témoin..

Un 2ème essai sur un dépôt plus concentré de cette phase aqueuse ne fait apparaître qu'une seule tache rose à la paraanisidine (fluorescence violette en U.V.) de $R_f = 0,19$, surmontée d'une longue trainée rose.

CHAPITRE III

Résultats chimiques

III - 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

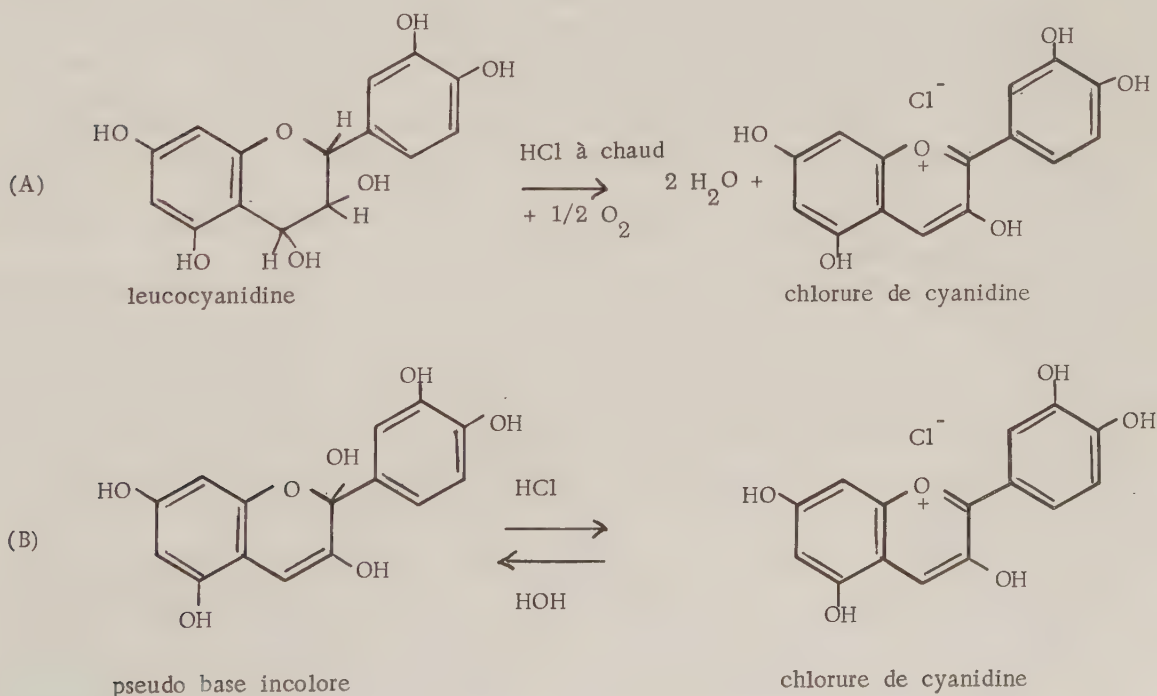
Les Fluviales sont subdivisées en un peu plus de 50 genres comptant environ 500 espèces ; leur intérêt économique est assez réduit et les études phytochimiques les concernant sont peu nombreuses.

Toutefois deux auteurs ont entrepris, soit expérimentalement, soit à l'aide de la bibliographie, une mise au point des résultats biochimiques concernant les "Hydrophytes" en général, et plus particulièrement les Fluviales.

Hegnauer (40) (1963) le premier, utilisant les travaux de Reznik et Neuhäusel (41) (1959) sur les Plantes aquatiques, a tenté de dégager certaines conclusions biochimiques et d'établir une classification chimiotaxinomique de ces végétaux.

Ses interprétations sont basées sur la présence ou l'absence, chez certaines espèces, d'anthocyanes "incolores" ou "anthocyanes pseudo-bases", ces substances sont différentes des leucoanthocyanes également incolores, largement répandues dans le règne végétal, dont nous avons déjà parlé.

En effet, alors que les leucoanthocyanes, présentant une structure de flavanne-3, 4 diol (A), ne sont transformées en anthocyanes que par un traitement oxydatif à chaud en milieu très acide, il suffit d'un traitement à froid par les mêmes acides pour colorer en rouge les anthocyanes "incolores". Il est possible de supposer que ces composés sont de véritables anthocyanes, stabilisés sous forme incolore (B).



Les anthocyanes pseudo-bases seraient amassées avant tout dans les feuilles submergées, à côté d'elles apparaissant parfois des anthocyanes typiques.

Hegnauer remarque (à propos des Aponogétonacées) que leur existence, étant conditionnée écologiquement, constitue une particularité des plantes aquatiques. Mais d'autre part, leur présence limitée à certaines espèces constitue un fait intéressant du point de vue systématique, en permettant de dégager des parentés à l'intérieur même de cet ensemble.

En effet, l'auteur conclue en proposant un mode de classement basé sur la présence de ces "anthocyanes pseudo-bases" :

- présence chez les Hydrocharitacées et les Aponogétonacées ;
- absence chez les Alismatacées et les Potamogetonacées.

Il faut noter enfin que les leucoanthocyanes typiques semblent manquer chez les Hélobiées.

En dehors de cette étude basée sur un seul type de constituants, l'existence d'autres composés a été mise en évidence chez des espèces particulières de l'ordre.

Nous relèverons à la suite de Karrer (42) et autres auteurs :

- la mise en évidence d'apiose ($C_5H_{10}O_5$) chez Posidonia australis (présence généralisée aux Hélobiées par C.F. Van Beusekom (43).
- la présence de caroténoïdes, xanthophylle et éloxanthine (xanthophylle époxyde) chez Elodea canadensis ;
- la présence de rhodoxanthine ($C_{40}H_{50}O_2$) chez Potamogeton natans, de même que dans Scirpus et Equisetum.

A propos de la rhodoxanthine qui constitue le pigment rouge caractéristique des Rhodophycées (= Algues rouges), Prat et Lippmaa (44) (1925) ont montré que les couleurs des tiges et des feuilles des Potamots n'étaient pas dues à des pigments solubles dans le suc cellulaire, mais à des colorants chromoplastiques.

Dans son ouvrage "Phytochemical Phylogeny", Harborne (45) (1970) consacre un chapitre à l'étude des "constituants secondaires des Angiospermes aquatiques" ; d'après Mc Clure, celles-ci sont considérées comme descendants des plantes terrestres qui seraient retournées "aux habitats aquatiques de leurs lointains ancêtres". Mais suivant les familles, tous les genres ne sont pas forcément aquatiques (sensu stricto).

Le retour à la vie aquatique s'accompagne de modifications morphologiques et phytochimiques. La plupart des plantes aquatiques ne semblent pas produire la série habituelle de constituants secondaires existant chez les plantes terrestres et, entre autres caractéristiques, le manque apparent d'aptitude soit à synthétiser, soit à accumuler, des classes particulières de composés, les rassemble en un groupe phytochimiquement intéressant.

Comme ni les constituants secondaires, ni les Angiospermes aquatiques ne peuvent être définis avec précision, il est particulièrement difficile de délimiter ce groupe de plantes sur un tel critère.

Toutefois, Arber (46) (1920) a classé en deux séries extrêmes, et avec tous les intermédiaires possibles :

- d'un côté, les plantes purement terrestres (mais capables tout de même d'accepter une submergence occasionnelle) ;
- de l'autre, les végétaux essentiellement aquatiques (ceux-ci ayant perdu toute capacité de vie terrestre).

Le phénomène d'hétérophyllie (c'est à dire forme différente des feuilles d'une même espèce) étant fréquent chez les plantes aquatiques, il semble à peu près certain que la structure particulière (lacunes aérifères, lignification réduite...) des tissus immergés soit une réponse morphogénétique au facteur mécanique que représente la densité relativement élevée du milieu aqueux (Allsopp, 1965).

Il paraît certain que l'émersion est accompagnée d'altérations significatives du métabolisme de la plante. L'étude de l'induction de la synthèse d'enzymes chez des jeunes feuilles de Nuphar luteum et Cyperus angustifolia par Rubin et Loginova (47) (1965) est en faveur de cette opinion : elle met en évidence le passage d'un type de métabolisme essentiellement anaérobie à un type aérobie, en réponse au passage d'un habitat aquatique à un habitat émergé ; de ce changement

métabolique fondamental, on peut attendre une influence sur la production qualitative et quantitative des constituants secondaires.

Il peut y avoir aussi d'autres différences fondamentales entre la biochimie phénolique normale des plantes terrestres et aquatiques. Pridham (48) (1964) rapporte que, lorsqu'on examine *in vivo* la capacité de tissus végétaux divers à convertir le quinol et le résorcinol en mono- β -D-glucopyranosides correspondants, l'activité est accentuée chez les Angiospermes à l'exception frappante des plantes aquatiques submergées : *Elodea canadensis*, *Utricularia vulgaris* et l'espèce nageante *Lemna minor* ; par contre, les pousses émergées de *Nymphaea alba* (aux racines immergées) produisent de hautes concentrations des deux glucosides.

Pridham suggère que, si la glucosylation sert de procédé de détoxication de composés phénoliques nocifs pouvant provenir soit du métabolisme normal de la plante, soit de l'environnement, il peut y avoir des différences fondamentales entre les plantes submergées et celles flottant librement (observations de Jurd et coll. (49) (1957) et de Wallace (50) (1967).

D'après Fluck (51) (1963), il est probable que beaucoup de plantes terrestres perdent des quantités considérables de constituants secondaires solubles dans l'eau à travers l'épiderme au contact de ce milieu (exemple : pluie, rosée...). Ceci peut être aussi bien appliqué aux plantes aquatiques.

Harborne cite également des expériences concernant divers constituants secondaires, réalisées par Tatsuta et Ochi (52) (1956), Bate-Smith et Swain (53) (1965), Li et Willaman (54) (1968) sur des végétaux plus ou moins aquatiques. Une meilleure compréhension de la distribution de ces constituants secondaires à travers les espèces d'une même famille, où tous les représentants ne sont pas aquatiques, devrait indiquer les changements phytochimiques imposés aux formes terrestres lorsqu'elles retournent à leur milieu ancestral.

Nous reportons ici les constituants phénoliques secondaires rares ou spéciaux, cités par Harborne comme susceptibles de posséder une signification systématique ; parmi ces composés, citons par exemple :

- la persicarine (*Oenanthe*, *Polygonum*) ;
- l'acide ellagique (dont la distribution a été utilisée pour réviser la position de la famille des Nymphaeacées dans les Ranales : Bate-Smith (55) (1968 a) ;
- le 3-glucosyl-glucuronide de quercétine (*Nelumbo*) ;
- les vicénines (*Spirodela*, *Lemna*, *Wolffia*).

Nous attarderons davantage sur les flavonoïdes qui sont les principaux métabolites secondaires bien étudiés chez les plantes aquatiques.

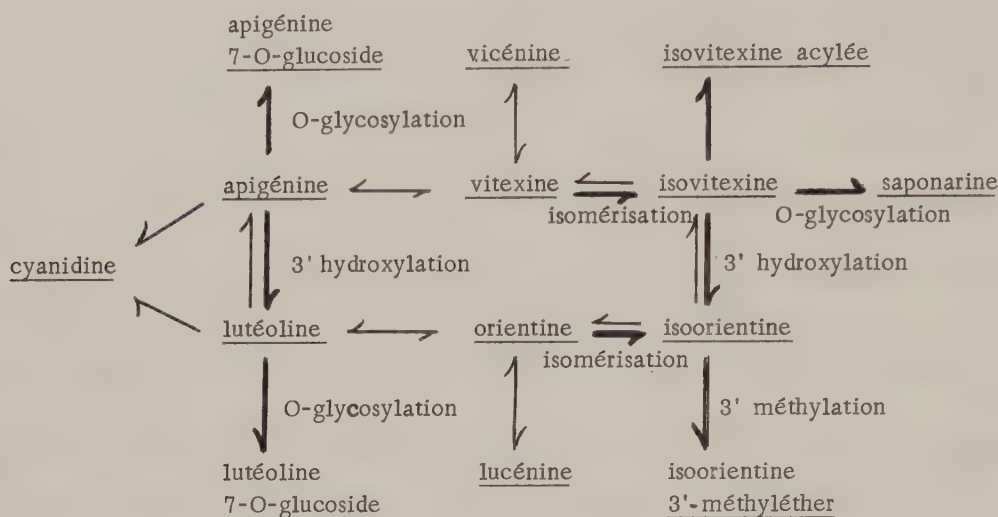
Ainsi, des études biosynthétiques et physiologiques ont été menées récemment sur les Lemnacees (56), mais elles se sont limitées à certains flavonoïdes : par exemple, biosynthèse du 3,5-diglucoside de pétunidine dans un clone (*) de *Spirodela oligorhiza*, étudiée depuis 1949 (Thimann et Edmondson (57) à 1964 (Thimann et Furuya (58)). Les auteurs appliquèrent la technique d'addition d'inhibiteurs, purines ou pyrimidines, sucres, régulateurs de croissance et enzymes, et mesurèrent également réponses à un éclaircissement de qualités et quantités différentes. Une bonne partie de leur travail a été revue en fonction d'autres études sur la physiologie de la biosynthèse flavonique.

Deux autres séries d'expériences renseignent sur la biosynthèse flavonique :

- 1) Interprétation des différents mécanismes de contrôle : la synthèse anthocyanique chez *Spirodela oligorhiza* est favorisée par les sucres et la lumière et inhibée par la présence d'agents complexants du cuivre et de composés contenant du soufre (purines et pyrimidines substituées). De plus, les régulateurs de croissance des plantes ont une petite influence directe sur le même phénomène . Furuya et Thimann (1964) en concluent que le contrôle de la synthèse anthocyanique s'effectue par une série complexe de mécanismes.
- 2) Incorporation de précurseurs radioactifs : celle-ci est relativement aisée pour les plantes aquatiques qui, par le fait de leur contact intime avec l'eau, absorbent aisément les substances hydrosolubles. Wallace et coll. (59) (1969) ont donc sélectionné diverses espèces de *Lemna* et *Spirodela* pour des recherches sur la synthèse des O- et C-glycosylflavones. Les plantes étaient cultivées sur un milieu contenant de la phénylalanine marquée ($1-C^{14}$) ; les flavones (apigénine, lutéoline, orientine,

(*) Un clone est un ensemble d'individus génétiquement semblables car obtenus par reproduction végétative à partir d'un seul plant d'origine.

homoorientine et isovitexine) se retrouvaient marquées en bonne quantité après quelques jours. Puis ces flavones marquées étaient réintroduites dans les milieux de culture de différentes Spirodela et Lemna. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous :



"Interconversion in vivo de O- et C-glucosylflavones dans Spirodela et Lemna (adapté de Wallace et coll. 1969)."

→ conversion ; ↔ pas d'interconversion.

Ce schéma implique que la biosynthèse des O- et C-glycosylflavones prend place par des voies parallèles, divergeant à une étape précoce. Peut-être la O-glycosylation est-elle la dernière étape prenant place après la fermeture du noyau flavonique, et la C-glycosylation est-elle une réaction plus précoce au niveau de la chalcone présumée ou de la flavanone intermédiaire (Wallace et Alston (60) (1966). La mise en évidence par ces auteurs de l'oxydation du noyau B des glycosides de l'apigénine en lutéoline, et non à la vitexine en orientine, permet quelques remarques concernant les étapes de l'hydroxylation en 3' (cf. résultats de Grisebach, 1968).

En conclusion, toutes les expériences radiochimiques de McClure sur Lemna et Spirodela tendent à montrer que la C-glycosylation de la flavone se produirait soit au stade chalcone, soit au stade encore plus précoce de l'unité malonique. Les flavones (marquées) ne sont pas les précurseurs des mono-C-glycoflavones et ces dernières ne sont pas les précurseurs des di-C-glycoflavones. Une seule exception a été remarquée : de la vitexine ¹⁴C aurait permis de trouver de la saponarétine ¹⁴C, mais l'inverse n'a pas été observé.

De plus, d'autres informations sur les processus de biosynthèse flavonique ont été fournies par les réponses de Spirodela intermedia soumise à photocontrôle (expériences de McClure (60), 1968, et Wallace (59), 1969).

Nous reportons les observations concernant ces processus sur les tableaux suivants.

Afin de pouvoir déceler l'orientine ou la quercétine, il est nécessaire de donner aux plantes au moins plusieurs heures d'éclairement quotidien en lumière blanche ou bleue de basse énergie (Norman, 1968). Par contre, les hydroxy-4' flavonoïdes homologues (vitexine et kaempférol) sont produits en bonne quantité quelles que soient les photoconditions.

Enfin, McClure et Alston (1966), après avoir isolé 186 clones de Lemnacées se sont servis des résultats biochimiques concernant cette famille dans un but systématique. Ils considèrent que le genre Spirodela serait le type ancestral des Lemnacées, ceci en raison de critères embryologiques, anatomiques, morphologiques mais aussi biochimiques ; on aurait la séquence : Spirodela → Lemna → Wolffiella → Wolffia. En effet, en considérant les flavonoïdes, Spirodela contient des anthocyanes, des flavonols, des C- et des O-glycosylflavones ; Lemna de même, sauf

CONTROLE DE LA BIOSYNTHESE FLAVONIQUE CHEZ SPIRODELA INTERMEDIA (a)

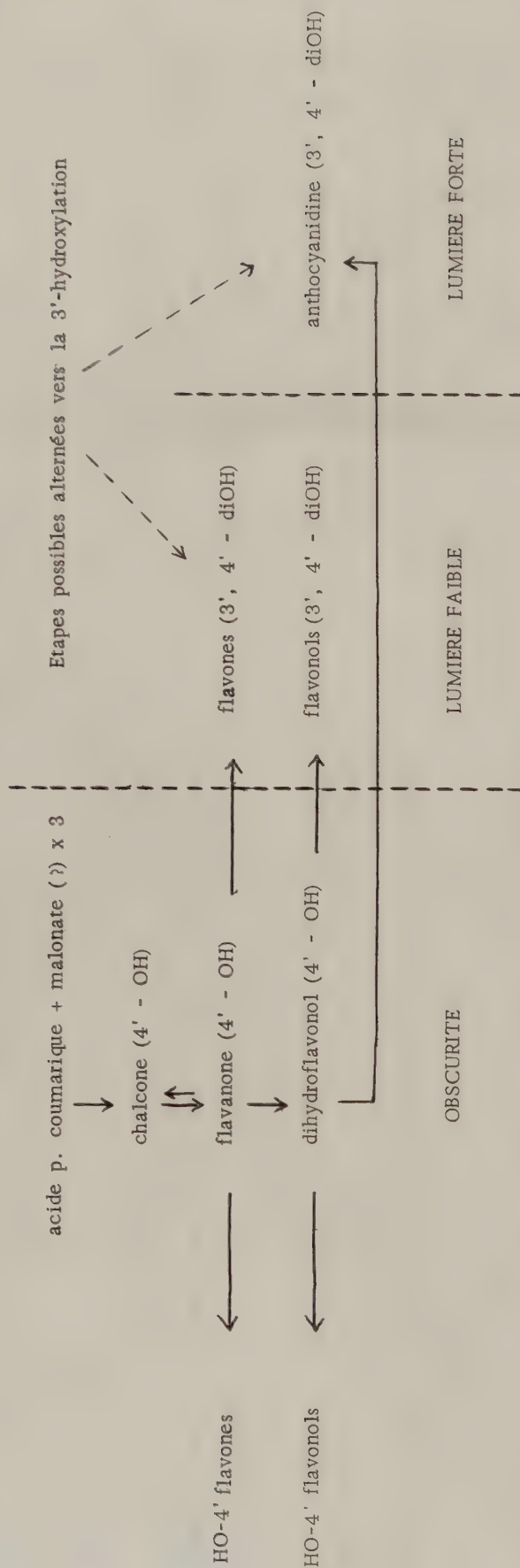
Conditions d'éclairement (b)	Mécanisme proposé	Production flavonique relative	Interaction des régulateurs de croissance (c)
Obscurité		Vitexine + Kaempférol +	La kinétine satisfait aux besoins de lumière pour la croissance.
4 mn de lumière rouge (à 1,1 kerg. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Augmentation de 5 fois de la croissance et parallèlement de la biosynthèse flavonique sous le contrôle du système phytochrome.	Vitexine + Kaempférol	Pas d'influence appréciable.
45 mn de lumière blanche ou bleue (à ca 3000 lux ou 1,2 kerg. $\text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ respect.)	Détermine la 3'-hydroxylation, augmente la croissance et les précurseurs flavoniques.	Vitexine + Kaempférol + Orientine + Quercétine +	La kinétine diminue vitexine et kaempférol. L'acide gibbéréllique induit une trace de glucosyl-3 cyanidine.
Lumière blanche continue (à ca 10000 lux)	Détermine le niveau d'oxydation de l'anthocyané. En outre favorise la croissance et la biosynthèse flavonique.	Vitexine ++ Kaempférol ++ Orientine ++ Quercétine ++ Glucosyl-3 cyanidine	La kinétine n'a aucune influence appréciable. L'acide gibbéréllique réduit légèrement à la fois la croissance et la synthèse de la glucosyl-3 cyanidine.

(a) Cultivées aseptiquement sur milieu de Hutner, avec 1% de saccharose à 26°C.

(b) Illumination toutes les 24 heures.

(c) Concentrations : 1,6.10⁻⁶M (kinétine) et 5.10⁻⁵M (acide gibbéréllique).

En résumé, les inductions biosynthétiques de photocontrôle chez Spirodela intermedia se schématisent ainsi :



Les réactions sombres conduisant aux niveaux de substitution de l'apigénine et de la vitexine (flavones) et du kaempférol (flavonol) sont favorisées par le système phytochrome. Une lumière de faible énergie est nécessaire pour l'introduction du groupe hydroxyle en 3' dans la lutéoline et l'orientine (flavone) et dans la quercétine (flavonol). Des énergies lumineuses plus fortes sont nécessaires pour la conversion des dihydroflavonols en anthocyanes.

Photocontrôles adaptés à partir du tableau précédent

(Schéma biosynthétique de Grisebach, 1968)

des flavonols : *Wolffiella* ne synthétise que les flavonols et *Wolffia* accumule soit des flavonols, soit des C-glycosylflavones, suivant les espèces. Il semble y avoir une direction phylétique de simplification croissante, à la fois de la morphologie et de la biosynthèse flavonique.

Si nous pensons avoir donné ci-dessus l'essentiel de la mise au point de Harborne sur les constituants secondaires des Angiospermes aquatiques, nous pouvons résumer l'ensemble des données phytochimiques en reprenant dans son "aperçu synoptique", la partie se rapportant plus directement à notre travail.

III - 2. DONNEES EXPERIMENTALES

Nous ne reviendrons pas ici sur les composés flavoniques identifiés chez *Potamogeton natans* ; nous les utiliserons néanmoins comme référence pour les autres espèces végétales étudiées, en précisant le mode de mise en évidence. Nous détaillerons par contre les composés existant dans d'autres Fluviales.

III - 2. 1. Leucoanthocyanes et Anthocyanes

La présence d'anthocyanes, après hydrolyse, a été mise en évidence par obtention d'un extrait butanolique rouge plus ou moins intense. Aucun dosage de produit purifié ne pouvant être réalisé, seul a été effectué un calcul de teneur (comparatif d'une espèce à l'autre), par mesure de la densité optique du pic d'absorption dans le domaine visible du spectre (λ_{max} voisin de 550 nm). Les résultats ont été précisés qualitativement par observations chromatographiques.

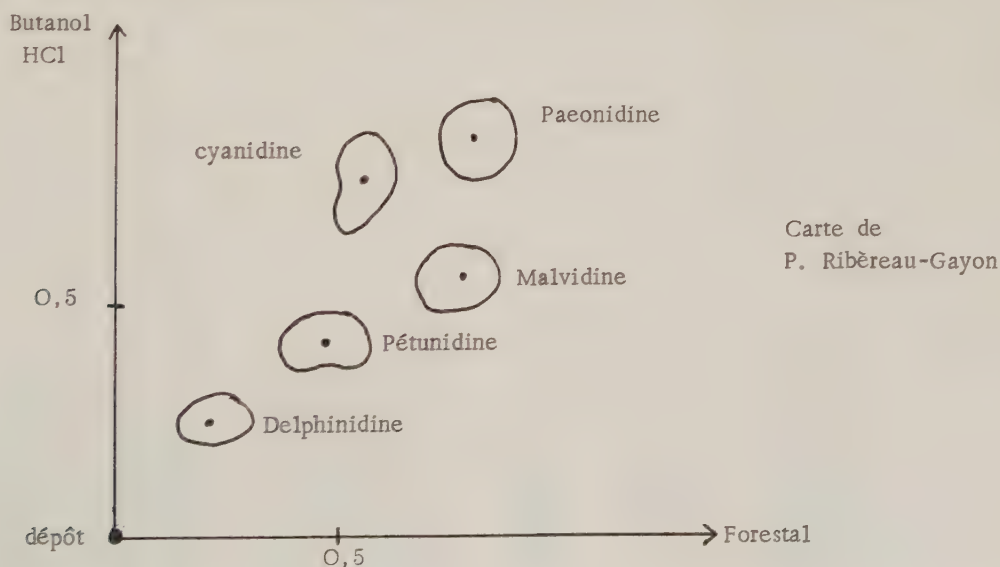
Pour ce faire, l'extrait butanolique est concentré, par extractions répétées, en ampoule à décanter, par de l'acide chlorhydrique 2N. Cette méthode a pour résultat de réduire le volume de la solution initiale sans changer de manière sensible la composition relative du mélange anthocyanique. Lorsqu'il ne reste plus qu'un à deux cm³ de solution butanolique, celle-ci est transférée dans un tube à hémolyse et concentrée de même à 0,5 cm³ ; le surnageant butanolique est utilisé aussitôt, en raison de l'instabilité des anthocyanes, pour dépôt chromatographique.

Le solvant "Forestal" étant insuffisant à lui seul pour déterminer la nature des taches, nous avons utilisé le système bidimensionnel de Ribèreau-Gayon (62) :

- solvant 1 : "Forestal",
- solvant 2 : Butanol chlorhydrique (2N),

et surtout sa "carte chromatographique" que nous reproduisons ci-dessous.

De plus, des produits de référence ont été la cyanidine et la delphinidine obtenues à partir de *Saxifraga cuneifolia* L. ; cette espèce nous a été fournie par M. Jay (63) et contient ces deux (leuco) anthocyanes en même proportion (ce qui est une aide précieuse en co-chromatographie).



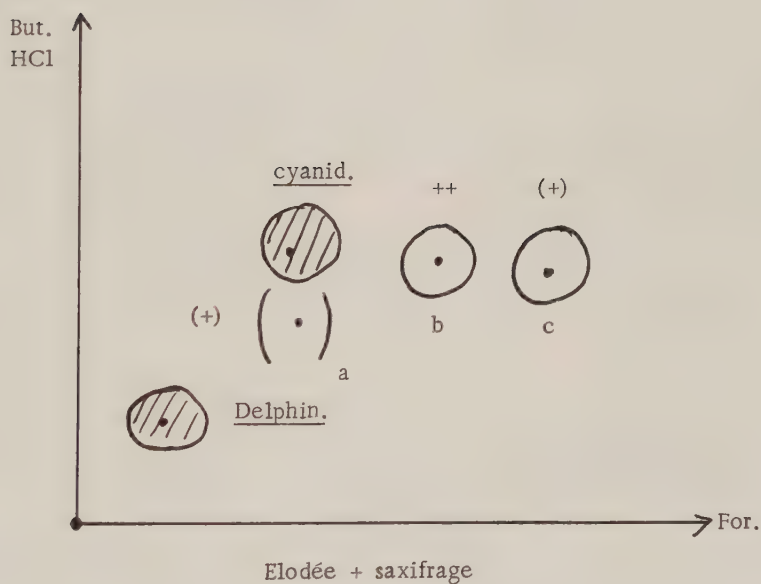
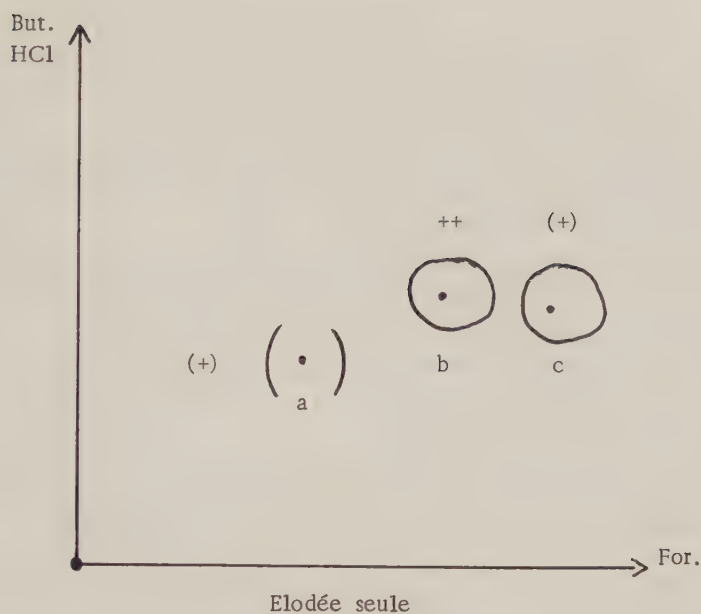
SYNOPSIS OF SECONDARY CONSTITUENTS OF AQUATIC ANGIOSPERMS

Compounds

Species	Alkaloids	Terpenoids	Simple phenolics	Flavonoids	Others	References
<u>Haloragaceae : 6 (c100)</u>						
<u>Haloragis alata</u>	-	-	E,caff pC	Qu,Km Cy (leuco?)	-	Bate-Smith, 1962
H. tetragyna	unk.	-	-	-	-	Willaman and Schubert, 1961
<u>Myriophyllum</u>	-	unk. saponin	E	Qu, Cy (leuco?)	cyanogenetic	Hegnauer, 1964 ; Bate-Smith, 1962 ; Reznik and Neuhausel, 1959 ; Hegnauer, 1958
<u>proserpinacoides</u>						
<u>Hippuridaceae : 1 (1)</u>						
<u>Hippuris vulgaris</u>	-	(no saponins)	E,caff,F scopoletin (?)	Km	tannins aucubin catalpol	Bate-Smith, 1962 ; Dekker, 1913 ; Hegnauer, 1967
<u>Callitrichaceae : 1 (c25)</u>						
<u>Callitriche palustris</u>	-	-	caff	Ap,Lu	aucubin catalpol	Hegnauer, 1967
<u>Menyanthaceae : 5 (c35)</u>						
<u>Menyanthes trifoliata</u>	-	betulinic acid	caff,S (?)	Km 3-rham Km 3-galact Qu 3-rutinoside	loganin	Karrer, 1958 ; Bate-Smith, 1962 ; Harborne, 1967
<u>Podostemaceae : c25 (c120)</u>						
<u>Hydrostachyaceae : 1 (c10)</u>	-	-	-	-	-	
<u>II. MONOCOTYLEDONS</u>						
<u>Butomaceae : 5 (c10)</u>						
<u>Butomus umbellatus</u>	(none)	-	pC,caff S	unk. antho (no leuco)	-	Hultin and Torsell, 1965 ; Hegnauer, 1963
<u>Hydrocharitaceae : 14 (C90)</u>						
<u>Hydrocharis</u>	(none)	(no saponins)	caff	Cy,Pg rutin	(no cyanogens) (no tannins)	Tjia-Lo and Hegnauer, 1956 ; Hegnauer, 1963
<u>morsus-ranae</u>						

<u>Elodea canadensis</u>	-	-	caff, cg	Qu, Cy (leuco ?)	-	Reznik and Neuhausel, 1959
<u>E. callitrichoides</u>	-	-	cg	Cy (leuco ?)	-	Reznik and Neuhausel, 1959
<u>E. crispa</u>	-	-	caff, cg	unk. antho	-	Reznik and Neuhausel, 1959
				unk. flavone		
<u>E. densa</u>	-	-	caff, cg	Cy digly, Qu	-	Reznik and Neuhausel, 1959
<u>Linnobium</u>	-	-	-	unk. antho	-	Bate-Smith, 1954
<u>stoloniferum</u>						
<u>Stratiotes aloides</u>	(none)	(no saponins)	caff	Cy (leuco ?)	(no cyanogens)	Tjia-Lo and Hegnauer, 1956 ;
				rutin (?)		Bate-Smith, 1968b ;
						Hegnauer, 1963
<u>Vallisneria spiralis</u>	-	-	caff, pC	(no antho)	-	Bate-Smith, 1968b ;
						Reznik and Neuhausel, 1959
<u>Alismaceae : 12 (c7O)</u>						
<u>Alisma</u>	✕	alisol A alisol B	-	(Cy (leuco ?)	(no cyanogens)	Hultin and Torsell, 1965 ;
<u>plantago-aquatica</u>				rutin (?)		Massagetov, 1967 ;
						Murata et al. 1968 ;
<u>A. lanceolata</u>	-	-	caff, pC, S, F p-OH ebznoic acid	-	-	Tjia-Lo and Hegnauer, 1965 ;
						Reznik and Neuhausel, 1959
						Bate-Smith, 1968b
<u>Sagittaria sp.</u>	✕	saponins	-	Cy (leuco ?)	(no cyanogens)	Tjia-Lo and Hegnauer, 1956 ;
						Hultin and Torsell, 1965 ;
						Altman, 1954 ;
<u>S. platyphylla</u>	-	-	caff, pC, F	-	-	Reznik and Neuhausel, 1959
<u>S. variabilis</u>	-	-	caff, S, F	Qu, Cy, Km	-	Bate-Smith, 1968b
<u>Scheuchzeriaceae : 1 (1)</u>						
<u>Scheuchzeria</u>	unk.	-	-	-	-	Bate-Smith, 1968b
<u>palustris</u>						Hultin and Torsell, 1965
<u>Juncaginaceae : 4 (c15)</u>						
<u>Tetroncium</u>	-	(no saponins)	-	-	-	Hegnauer, 1963
<u>magellanicum</u>						

Triglochin maritimum	unk.	(no saponins)	S, pC (?)	-	Hultin and Torsell, 1965 ; Bate-Smith, 1968b Gascoigne et al. 1948
T. procerum	-	-		My	
Liliaceae : 1 (1)	-	-	-	-	
Posidoniaceae : 1 (2)	-	-	-	-	
Posidonia oceanica	-	-	-	-	Phouphas, 1962 ; Van Beusekom, 1967
Aponogetonaceae : 1 (c3O)	-	-	-	-	
Aponogeton distachyum	-	-	-	Cy 3, 5-digly Cy 3-gly Qu, Km	Reznik and Neuhausel, 1959
A. krauseanus	-	-	caff, S, F, p-OH benzoic acid	-	Bate-Smith, 1968
Zosteraceae : 2 (c12)	-	-	caff, pC	-	Bate-Smith, 1968b ; Phouphas, 1962 ; Van Beusekom, 1967
Zostera nana	-	-		tannins much apiose	
Potamogetonaceae : 2 (c9O)	(none)	(no saponins)	-	-	Hegnauer, 1963 ; Van Beusekom, 1967
Potamogeton pectinatus	(none)	(no saponins)	-	-	Hegnauer, 1963
P. perfoliatus	(none)	(no saponins)	-	-	Hegnauer, 1963
P. ramosus	-	-	-	-	Tjia-Lo and Hegnauer, 1956
P. crispus	unk.	-	-	rutin	Hultin and Torsell, 1965
P. natans	-	-	-	(no antho)	Reznik and Neuhausel, 1959
Potamogeton sp.	-	-	-	-	
Ruppiaceae : 1 (3)	-	(no saponins)	-	-	Ricardi, 1958
Ruppia fillifolia	-	(no saponins)	-	-	Ricardi, 1958
R. maritima	-	(no saponins)	-	-	Ricardi, 1958
Zannichelliaceae : 6 (c25)	-	(no saponins)	-	-	
Zannichellia palustris	-	-	-	-	
Najadaceae : 1 (c35)	-	-	-	-	
Najas marina	-	-	-	Cy	Bate-Smith, 1968b



A) Etude des anthocyanes obtenues après hydrolyse d'Elodea canadensis ($\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$) :

3 taches apparaissent sur la chromatographie bidimensionnelle :

- a) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Rf} = 0,44 \text{ dans le Forestal (la cyanidine témoin étant à Rf} = 0,48) ; \\ \text{Rf} = 0,46 \text{ dans le Butanol chlorhydrique.} \end{array} \right.$
Couleur : rose-rouge ;
Fluorescence UV : rose mauve.

En se rapportant à la carte de Ribéreau-Gayon, "a" est homologuée à la pétunidine, c'est à dire la méthyl-3' delphinidine (car les Rf sont inférieurs à ceux de la cyanidine dans les deux solvants).

- b) $\left\{ \begin{array}{l} \text{Rf} = 0,62 \text{ dans le Forestal ;} \\ \text{Rf} = 0,64 \text{ dans le Butanol chlorhydrique.} \end{array} \right.$
Couleur : rouge ;
Fluorescence UV : rose-rouge.

C'est la tache la plus importante ; "b" doit être la paeonidine, c'est à dire la méthyl-3' cyanidine, car elle ne peut être la malvidine (= diméthyl-3', 5' delphinidine) à cause du Rf dans le deuxième

solvant.

- c) $\left\{ \begin{array}{l} R_f = 0,73 \text{ dans le Forestal ;} \\ R_f = 0,64 \text{ dans le Butanol chlorhydrique.} \end{array} \right.$
Couleur pourpre, faible, car faible teneur ;
Fluorescence UV : rose.

"c" pourrait être la substance appelée "LA 72" par Voirin (14) et rencontrée chez Asplenium trichomanes (= triméthyl-5,5',7 delphinidine ?).

Les pigments du Saxifrage utilisés en témoins internes co-chromatographiques avaient le comportement suivant :

- Delphinidine : $\left\{ \begin{array}{l} R_f = 0,31 \text{ dans le Forestal ;} \\ R_f = 0,54 \text{ dans le Butanol chlorhydrique.} \end{array} \right.$
Cyanidine : $\left\{ \begin{array}{l} R_f = 0,48 \text{ dans le Forestal ;} \\ R_f = 0,68 \text{ dans le Butanol chlorhydrique.} \end{array} \right.$

Il est intéressant de signaler que les trois anthocyanes de l'Elodée ont été mises en évidence après hydrolyse de 10 g de plante fraîche, alors qu'une première manipulation sur 2 g de matériel séché n'avait fourni aucune indication sur la présence d'anthocyanes.

B) Etude de la fraction butanolique de Stratiotes aloïdes ($\lambda_{\text{max}} = 544 \text{ nm}$ dans le butanol acide).

La chromatographie ne donne qu'une tache de couleur rouge, de fluorescence rose-mauve, superposable à la cyanidine.

Sans vouloir détailler davantage le mode opératoire, nous préciserons ci-dessous dans quelles espèces nous avons identifié :

- la cyanidine : Stratiotes aloïdes,
Butomus umbellatus,
Nelumbo nucifera,
Nymphaea zanzibariensis,
Ceratophyllum sp,
- la delphinidine : Nymphaea zanzibariensis,
Ceratophyllum sp,
- la paeonidine : Elodea canadensis,
- la pétunidine : Elodea canadensis,
Hydrocharis morsus-ranae,
- la triméthyl-5,5',7 delphinidine (?) : Elodea canadensis.

Remarques :

Chez Hydrocharis, Nymphaea et Nelumbo, il préexiste des anthocyanes à l'état naturel ou de pseudo-base, puisque la solution aqueuse chlorhydrique s'est colorée en rose-rouge après quelques instants de contact avec ces plantes.

La présence d'anthocyanes après traitement acide n'exclue pas celle de C-glucosylflavones dans le même extrait butanolique ; c'est ce que nous avons effectivement observé chez Butomus et Elodea.

III - 2. 2. Aglycones flavoniques

Tous les aglycones flavoniques que nous avons mis en évidence, proviennent de plantes hydrolysées pendant 40 mn par l'acide chlorhydrique 2N au bain-marie bouillant ; sauf dans le cas de Potamogeton natans, il ne nous est pas possible de préciser l'état naturel, glycosylé ou non, des substances ainsi obtenues. Les produits identifiés se subdivisent en deux séries d'inégale répartition systématique chez les Hydrophytes étudiées :

- les flavonols, assez rares ici ;
- les flavones, beaucoup plus répandues, contrairement à l'ensemble des Angiospermes.

III - 2. 2. 1. Flavonols et acide ellagique

- Quercétine, ou pentahydroxy-3,3',4',5,7 flavone :

Spectres UV :

EtOH 95° : 256, (271), (293), 373 nm.

NaOAc : 274, (bande II) . $\Delta\lambda_{II} = + 18$ nm.

H₃BO₃ : (bande I), 390 nm. $\Delta\lambda_{I}^{II} = + 17$ nm.

Comportement chromatographique :

- Fluorescence jaune-orange en lumière UV (350 nm) ;
jaune-vert après vaporisation de chlorure d'aluminium en solution alcoolique.
- Sur papier, Rf = 0,32 dans l'acide acétique 60% ;
Sur plaque de gel de silice, Rf = 0,32 dans le solvant Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique (5-4-1, v/v).

La quercétine a été rencontrée dans les phases étherées de :

Nelumbo nucifera,

Nymphaea zanzibariensis. (Comme cette dernière espèce renferme de l'acide ellagique, il n'a pas été possible d'obtenir un spectre UV correct de quercétine, celle-ci étant masquée par celui-là).

- Kaempférol, ou tétrahydroxy-3,4',5,7 flavone :

Spectres UV :

EtOH 95° : (253), 266, (290), (323), 369 nm.

NaOAc : 274 (bande II) . $\Delta\lambda_{II} = + 8$ nm.

H₃BO₃ : (bande I) 370 nm. $\Delta\lambda_{I}^{II} = \pm 0$ nm.

Comportement chromatographique :

- Fluorescence jaune en lumière de Wood ;
jaune-vert après vaporisation de chlorure d'aluminium.
- Sur papier, Rf = 0,44 dans l'acide acétique 60% ;
Sur plaque de gel de silice,
Rf = 0,57 dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique ;
Rf = 0,44 dans Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique.

Le kaempférol a été rencontré chez Nelumbo nucifera.

- Acide ellagique :

Spectres UV :

EtOH 95° : 255, (très intense), (355), 365 nm.

L'acétate de sodium produit un déplacement hypsochrome de 11 nm de la bande I, et la bande II double son intensité (64).

Comportement chromatographique :

- Fluorescence bleue ;
 - Sur papier, Rf = 0,30 dans l'acide acétique 60%.
- L'acide ellagique a été rencontré chez :

Nymphaea zanzibariensis,

Cabomba caroliniana.

- Autres flavonols :

Une tache jaune-orange en UV, provenant de la phase étherée de Nelumbo nucifera, se trouve à Rf = 0,40 dans l'acide acétique 60% (c'est à dire entre la quercétine de Rf = 0,31 et le kaempférol de Rf = 0,44) ; le problème n'a pu être précisé davantage (s'agirait-il d'isorhamnétine ?).

Butomus umbellatus fournit 4 taches en chromatographie analytique d'aglycones, mais il a été impossible de les éluer, donc d'obtenir leur spectre UV et de les rechromatographier. Notons cependant leur position et leur fluorescence sur papier Whatman 1, après migration dans l'acide acétique 60% :

- 1 : vert-jaune très brillant ; Rf = 0,31 +++ (méthyl-5 quercétine ou azaléatine ?)
- 2 : brun ; Rf = 0,49 ++

- 3 : vert-jaune ; $R_f = 0,54 +$

- 4 : vert-jaune ; $R_f = 0,62 +$

Pourtant le dosage différentiel par le chlorure d'aluminium, avec $\lambda_{\max}$ à 426 nm, semble impliquer une structure de flavonol, au moins pour le constituant principal.

Hydrocharis morsus-ranae, bien que donnant dans l'acide acétique 60% des bandes chromatographiques diversement colorées, ne semble contenir aucun flavonol, comme en témoigne la réaction négative au magnésium chlorhydrique (réaction de Shinoda, au cours de laquelle se forment des sels de flavylium (65).

Quant à Alisma plantago, il semble contenir une faible quantité d'un flavonol instable, de R_f assez bas dans l'acide acétique 60%.

Enfin Sagittaria sagittifolia offre une particularité qui n'a pu être expliquée davantage : le spectre global de la phase étherée dans l'éthanol à 95° semble indiquer la présence d'une aurone ; mais le spectre n'accusant pas de déplacement de la bande I en présence de chlorure d'aluminium, cette éventuelle aurone ne doit pas présenter d'hydroxyle en position 4. Aucune confirmation n'a pu être apportée à ces observations car il n'a pas été possible d'éluer de bandes préparatives après divers essais de séparation chromatographique.



III - 2. 2. 2. Flavones

- La lutéoline, ou tétrahydroxy-3',4',5,7 flavone, a été déjà décrite au chapitre précédent, dans le cadre d'étude des flavonoïdes de Potamogeton natans ; nous ne reviendrons pas sur les différentes études spectrales détaillées à ce propos.

Cette flavone a été mise en évidence dans beaucoup d'autres Fluviales, soit par simple chromatographie suivie de révélation par le réactif de Bénédict, soit à l'aide de spectres UV obtenus après élution des bandes chromatographiques par l'éthanol 95°.

Nous allons énumérer les différentes espèces où la lutéoline a été rencontrée, en précisant dans chaque cas les critères d'identification :

Potamogeton natans (chromatographies ; spectres UV ; spectre IR) ;

Potamogeton densus (chromatographies ; spectres UV) ;

Potamogeton fluitans (chromatographies ; spectres UV) ;

Potamogeton pectinatus (chromatographies ; spectre UV) ;

Zostera angustifolia (chromatographies ; spectres UV) ;

Zostera marina (chromatographies ; spectres UV) ;

Zannichellia palustris (chromatographies ; spectres UV) ;

Elodea canadensis (chromatographies ; spectres UV) ;

Stratiotes aloides (chromatographies ; spectres UV) ;

Triglochin palustris (chromatographies ; spectres UV) ;
Ruppia maritima (chromatographies ; spectre UV) ;
Ceratophyllum sp. (chromatographies).

- L'apigénine, ou trihydroxy-4',5,7 flavone, a une fluorescence violette à 350 nm ; à cette même longueur d'onde, elle apparaît jaune-orangé après vaporisation de réactif de Bénédict.

Son comportement spectral UV est le suivant :

EtOH 95° :	271, (300), 340 nm.	
NaOAc :	279, 389 nm.	$\Delta\lambda_{II} = + 8 \text{ nm.}$
H ₃ BO ₃ :	270, 340 nm.	$\Delta\lambda_{I} = + 0 \text{ nm.}$
AlCl ₃ :	281, 304, 343, 385 nm.	$\Delta\lambda_{I} = + 45 \text{ nm.}$
NaOEt :	278, 332, 403 nm.	$\Delta\lambda_{I} = + 63 \text{ nm.}$

Du point de vue chromatographique, cette flavone se trouve :

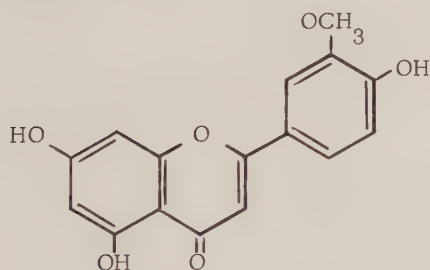
- sur papier, à R_f = 0,65 dans l'acide acétique 60% ;
(R_f = 0,70 dans ce même solvant, mais avec irrigation préalable du papier par l'acide acétique 2%) ;
R_f = 0,58 dans le solvant de Winicki ;
- sur plaque de gel de silice,
à R_f = 0,39 dans Benzène-Dioxanne-Acide acétique ;
R_f = 0,38 dans Benzène-Pyridine-Ammoniaque.

L'apigénine a été mise en évidence chez :

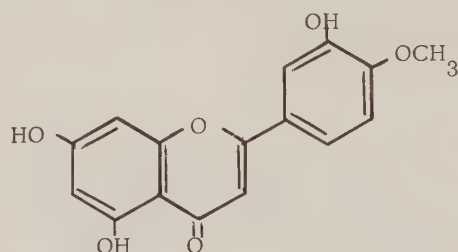
Ceratophyllum (chromatographies ; spectre UV) ;
Potamogeton densus (chromatographies ; spectres UV) ;
Zostera angustifolia (chromatographies ; spectres UV) ;
Echinodorus muricatus (chromatographies).

- Chrysoériol - Diosmétine.

Ces deux aglycones flavoniques sont des isomères de position au niveau du phényle latéral :



Chrysoériol, ou
méthyl-3' lutéoline.



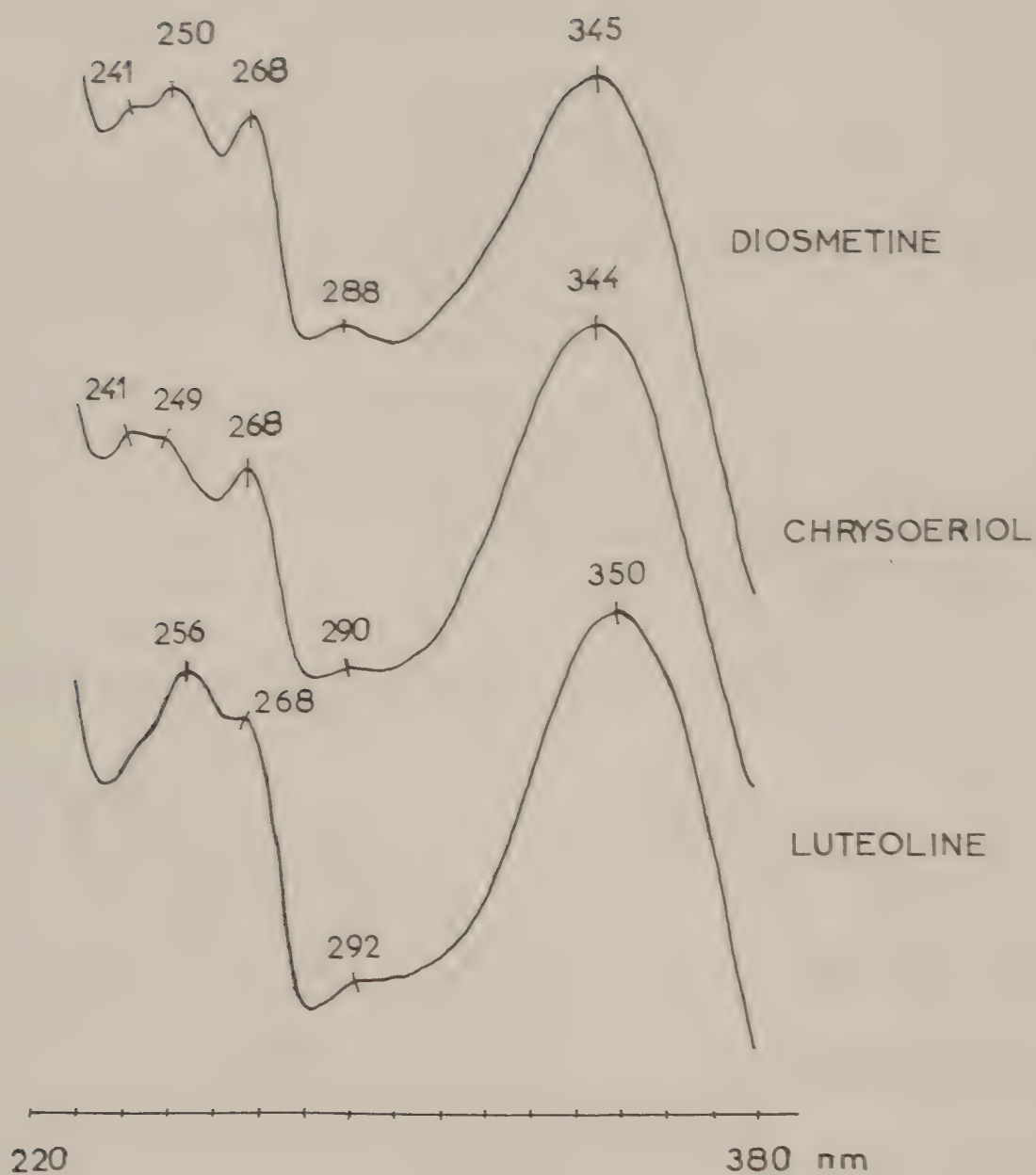
Diosmétine, ou
méthyl-4' lutéoline.

Leur comportement chromatographique est souvent très proche ; il est alors difficile de les distinguer, et ce que l'on observe effectivement :

- dans l'acide acétique 60% ; sur papier ;
 - dans le Benzène-Dioxanne-Acide acétique, sur plaque de gel de silice.
- C'est seulement sur plaque de gel, dans le solvant Benzène-Pyridine-Ammoniaque ou dans le Toluène-Formiate d'éthyle-Acide formique, qu'il est possible de les séparer de façon certaine ; avec d'autres solvants, ils sont distincts l'un de l'autre, mais il apparaît alors des interférences avec l'apigénine.

Lorsque les taches chromatographiques sont suffisamment séparées, le réactif de Bénédict donne d'autres précisions ; il révèle :

- la diosmétine en rouge-brun,
- le chrysoériol en jaune-vert.



SOLVANT : METHANOL RP

Enfin, un critère plus sûr pour trancher entre ces deux produits est le spectre d'absorption UV de leur solution méthanolique, dans la région 240-270 nm qui englobe la bande II (figure).

Diosmétine et chrysoériol se distinguent tout d'abord nettement de la lutéoline par l'allure du pic situé vers 268 nm, celui-ci se détachant nettement dans les deux premières flavones, alors qu'il se présente seulement sous forme d'inflexion dans le cas de la lutéoline. En considérant la bande I, le maximum de densité optique se trouve à la même longueur d'onde (344-345 nm) pour ces deux flavones, alors qu'il se situe vers 350 nm dans le cas de la lutéoline.

La différence spectrale essentielle entre diosmétine et chrysoériol réside dans les densités optiques à 240 et 250 nm.

Diosmétine : $DO_{240 \text{ nm}} \ll DO_{250 \text{ nm}}$.

Chrysoériol : $DO_{240 \text{ nm}} \gg DO_{250 \text{ nm}}$ et
 $\gg DO_{270 \text{ nm}}$.

Etude des comportements spectraux particuliers, en présence de réactifs :

CHRYSOERIOL

MeOH RP : 241, (249), 267, (288), 344 nm.
 NaOAc : 271, 395 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 22 \text{ nm}$.
 H_3BO_3 : 268, 347 nm. $\Delta\lambda_I = \pm 0 \text{ nm}$.
 $AlCl_3$: 262, 274, 294, 353, 386 nm. $\Delta\lambda_I = + 42 \text{ nm}$.
 NaOMe : 405 nm. $\Delta\lambda_I = + 61 \text{ nm}$.

DIOSMETINE

MeOH RP : (240), 250, 267, (288), 344 nm.
 NaOAc : 273, 375 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 23 \text{ nm}$.
 H_3BO_3 : (250), 268, 344 nm. $\Delta\lambda_I = \pm 0 \text{ nm}$.
 $AlCl_3$: (258), 276, (293), 348, 381 nm. $\Delta\lambda_I = + 37 \text{ nm}$.
 NaOMe : 385 nm. $\Delta\lambda_I = + 41 \text{ nm}$.

Notons en particulier le déplacement de la bande I en présence de méthylate de sodium : le déplacement bathochrome obtenu est plus intense lorsque le groupement hydroxyle est en position 4' ($\Delta\lambda_{I\#} + 60 \text{ nm}$ pour le chrysoériol) que lorsqu'il est en position 3' ($\Delta\lambda_{I\#} + 40 \text{ nm}$ pour la diosmétine).

Comportement chromatographique :

	I	2	3	4
Chrysoériol	0,60	0,32?	0,26	0,48
Diosmétine	0,60	0,59?	0,38	0,43

Solvants : - 1 = Acide acétique 60% ; | papier
 - 2 = Solvant de Winicki ; |
 - 3 = Benzène-Dioxanne-Acide acétique ; | plaque
 - 4 = Benzène-Pyridine-Ammoniaque. |

Sans oublier Potamogeton natans, le chrysoériol a été rencontré chez :
Zannichellia palustris (chromatographies ; spectres UV) ;
Zostera angustifolia (chromatographies ; spectres UV) ;
Zostera marina (chromatographies) ;
Statiotes aloides (chromatographies) ;
Elodea canadensis (chromatographies ; spectres UV)

TABLEAU RECAPITULATIF DES Rf DES AGLYCONES LES PLUS FREQUENTS, DANS DIVERS SOLVANTS :

	1	2	3	4
Lutéoline	0,50	0,26	0,14	0,18
Apigénine	0,65	0,58	0,38	0,38
Diosmétine	0,60	0,59	0,38	0,43
Chrysoériol	0,60	0,32	0,26	0,48
Quercétine	0,32	-	-	-
Kaempférol	0,46	-	-	0,50

Solvants · 1 = Acide acétique 60% | sur papier
2 = Solvant de Winicki
3 = Benzène-Pyridine-Ammoniaque | sur plaque de gel de silice.
4 = Benzène-Dioxane-Acide acétique

Ruppia maritima (chromatographies ; spectre UV) ;
Triglochin palustris (chromatographies, spectres UV).

La diosmétine est présente de façon sûre chez Zostera angustifolia (chromatographies et spectres UV).

Lorsque nous n'avons pas pu trancher nettement entre les deux flavones, nous indiquons seulement : "chrys-dio. ".

Il y a donc beaucoup de Fluviales où nous avons pu mettre en évidence des flavones, tandis que rares sont les plantes à flavonols. Mais il ne faut pas oublier non plus que bien des taches chromatographiques n'ont pu être identifiées, en particulier chez les Alismatales.

Un autre type de dérivé flavonique, en général assez abondant dans les phases butanoliques après hydrolyse, s'est révélé très intéressant dans le cadre de notre étude chimiotaxinomique : il s'agit des C-glycosyl-flavones, de répartition assez générale à travers les deux ordres.

III - 2. 3 C-Glycosyl-Flavones

Nous abordons ici l'étude de composés flavoniques particuliers, de répartition assez générale à l'intérieur des Fluviales. Les deux séries d'isomères mono-glucosylés de la lutéoline et du chrysoériol ont été déjà longuement décrits à propos de Potamogeton natans, c'est pourquoi nous allons simplement énumérer les autres représentants des Hélobiées contenant ces substances, en précisant chaque fois le ou les critères d'identification. Par contre, nous exposerons un peu plus longuement le comportement spectral et chromatographique des différentes C-glycosyl-apigénines.

Ici encore, tous ces composés sont obtenus après traitement hydrolytique acide, provoquant certainement des isomérisations, si bien que nous ne pouvons préciser la forme naturelle de ces dérivés flavoniques ; il est toutefois probable que le constituant majeur représente la forme naturelle.

III - 2. 3. 1. C-Glycosyl-lutéolines

ORIENTINE, ou C- β -D-glucopyranosyl-8 lutéoline, rencontrée chez :
Sagittaria montevidensis (chromatographies ; spectres UV ; spectre IR) ;
Potamogeton fluitans (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton densus (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton pectinatus (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton lucens (chromatographies ; spectres UV).

HOMOORIENTINE, ou C- β -D-glucopyranosyl-6 lutéoline, présente chez :
Sagittaria montevidensis (chromatographies ; spectres UV ; spectre IR) ;
Sagittaria sagittifolia (chromatographies ; spectres UV) ;
Echinodorus muricatus (chromatographies ; spectres UV) ;
Alisma plantago (chromatographies ; spectres UV) ;
Limnocharis plumieri (chromatographies ; spectres UV) ;
Butomus umbellatus (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton lucens (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton fluitans (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton densus (chromatographies ; spectres UV) ;
Potamogeton pectinatus (chromatographies) ;
Triglochin maritimum (chromatographies).

AUTRES C-GLYCOSYL-LUTEOLINES :

Une chromatographie comparative des différentes " C-glycosyl-lutéolines " rencontrées dans les Fluviales, a été conduite dans l'acide acétique 15%, en présence d'orientine de synthèse et d'orientine de Potamogeton natans comme témoins. Il en ressort que beaucoup d'échantillons contiennent une C-glycosyl-flavone très proche de la véritable orientine du point de vue spectral, mais un peu différente en chromatographie (Rf de l'orientine de synthèse, de celles de Potamogeton natans et de Sagittaria montevidensis de l'ordre de 0,22, alors que "l'orientine" d'Alisma

TABLEAU RECAPITULATIF DES Rf DES C-GLYCOSYL-FLAVONES LES PLUS COURANTES CHEZ LES FLUVIALES :

	1	2	3	4	5	6	7
Orientine	0,20	0,31	0,45	0,43	0,17	0,75	0,53
Homoorientine	0,36	0,41	0,57	0,64	0,28	0,63	0,67
Scoparine	0,18	0,29	0,45	0,56	0,65	0,78	0,71
Isoscoparine	0,34	0,48		0,77	0,51	0,65	0,80
Vitexine	0,26	0,43	0,58	0,63	0,65	0,80	
Saponarétine	0,43	0,55	0,71	0,83	0,58	0,26	
X	0,20	0,65 0,75	0,80			0,95	

Solvants : 1 = Acide acétique 15%

2 = BAW 415

3 = BAW 27%

4 = Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (30-10-3)

5 = "APEM"

6 = Solvant "5.3.1.1."

7 = Acétate d'éthyle-Acide formique-Eau (65-15-20)

} papier
} plaques

plantago, de Butomus umbellatus... se trouve à $R_f = 0,18$ dans l'acide acétique 15% préparé avec une solution aqueuse d'EDTA à 1%) ; c'est ce que nous avons observé avec :

Butomus umbellatus,
Limnocharis plumieri,
Alisma plantago,
Sagittaria sagittifolia,
Echinodorus muricatus.

Un problème analogue s'est posé en comparant une tache de glycoflavone avec l'homoorientine témoin, dans le cas de :

Sagittaria sagittifolia,
Sagittaria montevidensis,
Potamogeton pectinatus.

Enfin, les phases butanoliques de Triglochin palustris et Elodea canadensis révèlent des taches dont la position et les couleurs de révélation rappellent le composé "X" de Potamogeton natans.

Remarque

Notre méthode d'identification des diverses C-glycoflavones est basée sur la "carte chromatographique" obtenue à partir de la phase butanolique de Potamogeton natans (BAW puis Acide acétique 15%). Nous avons opéré ensuite de proche en proche, c'est à dire en réalisant des séries de cochromatographies avec, par exemple, Potamogeton natans + Sagittaria montevidensis ; puis cette dernière + Sagittaria sagittifolia, etc...

III - 2. 3. 2. C-glycosyl-chrysoériols

SCOPARINE, ou méthyl-3' orientine, ou C-glucosyl-8 chrysoérior (on dit aussi scoparoside). Elle a été mise en évidence chez :

Alisma plantago (chromatographies ; spectres UV) ;
Echinodorus muricatus (chromatographies ; spectres UV) ;
Sagittaria sagittifolia (chromatographies ; spectres UV).

ISOSCOPAROSIDE, ou C-glucosyl-6 chrysoérior :

Cette substance, isomère de la précédente, a chaque fois été rencontrée avec la scoparine ; ceci est le résultat de l'hydrolyse acide, qui a provoqué l'isomérisation de l'une ou l'autre de ces glycoflavones.

III - 2. 3. 3. C-glycosyl-apigénines

VITEXINE, ou C- β -D-glucopyranosyl-8 apigénine (*) :

Comportement spectral UV :

EtOH 95° : 271, 300, 338 nm.

NaOAc : (272), 280, 302, 350 nm. $\Delta\lambda_{II} = + 9$ nm.

H₃BO₃ : 271, 340 nm. $\Delta\lambda_I = \pm 0$ nm.

En chromatographie, la tache obtenue, de fluorescence brun-violet, se révèle en jaune-orangé après pulvérisation du réactif de Bénédict ; si la révélation est conduite par la benzidine bisdiazotée en présence de carbonate de sodium, la tache apparaît rouge-brun en lumière visible.

La vitexine se trouve :

- sur papier, à $R_f = 0,11$ dans l'acide acétique 2% ;
 $R_f = 0,26$ dans l'acide acétique 15% ;

(*) La vitexine fut isolée pour la première fois par Perkin (66), après hydrolyse chlorhydrique des extraits aqueux du bois de Vitex littoralis.

Rf = 0,43 dans le BAW 415 ;

Rf = 0,63 dans le BAW 27% ;

- sur plaque de gel de silice, à Rf = 0,80 dans le solvant "5.3.1.1".

Elle a été identifiée chez :

Butomus umbellatus (chromatographies ; spectres UV) ;

Limnocharis plumieri (chromatographies ; spectres UV) ;

Cabomba caroliniana (chromatographies ; spectres UV).

SAPONARETINE, ou C-~~B~~-D-glucopyranosyl-6 apigénine (✱) :

C'est l'isomère de la précédente : le comportement spectral est pratiquement le même du point de vue de l'absorption UV. Il en est de même en ce qui concerne teinte ou fluorescence avec divers réactifs. Les différences essentielles se situent dans le comportement chromatographique, la saponarétine étant située :

- sur papier, à Rf = 0,22 dans l'acide acétique 2% ;

Rf = 0,43 dans l'acide acétique 15% ;

Rf = 0,56 dans le BAW 415 ;

Rf = 0,76 dans le BAW 27% ;

sur plaque de gel de silice, à Rf = 0,26 dans le solvant "5.3.1.1".

Cette substance a été mise en évidence chez :

Limnocharis plumieri (chromatographies ; spectres UV) ;

Cabomba caroliniana (chromatographies ; spectres UV).

DI-C-GLYCOSYL-APIGENINES :

De tels composés ont une position bien différente des mono-C-glycoflavones homologues en chromatographie dans l'acide acétique 2%, où ils migrent nettement plus loin ; nous avons ainsi élué une large bande brun-violet de haut Rf, provenant de la phase butanolique de Cabomba caroliniana (située entre 0,35 et 0,50).

En faisant migrer l'éluat obtenu dans le solvant "APEM", trois taches se sont nettement séparées, mais il n'a pas été possible de les identifier à des di-C-glycosides d'apigénine connus, fournis par M.L. Bouillant ; leur étude mériterait d'être davantage approfondie.

Remarque

Comment peut-on distinguer 2 C-glycosyl-flavones isomères d'un même aglycone ?

Nos observations ont été déduites des spectres fournis par Mabry ("The Systematic Identification of Flavonoids", 1970) et concernent les substances que nous avons isolées (λ_{max} dans le méthanol).

C-glucosyl-lutéolines

- Orientine (C-glu.-8) : $\text{DO}_{255 \text{ nm}}$ $\neq$ $\text{DO}_{346 \text{ nm}}$.

$\text{DO}_{255 \text{ nm}}$ $>$ $\text{DO}_{267 \text{ nm}}$.

- Homoorientine (C-glu.-8) : $\text{DO}_{255 \text{ nm}}$ $<$ $\text{DO}_{349 \text{ nm}}$.

$\text{DO}_{255 \text{ nm}}$ $<$ $\text{DO}_{267 \text{ nm}}$.

C-glucosyl-apigénines

- Vitexine (C-glu.-8) : $\text{DO}_{270 \text{ nm}}$ $>$ $\text{DO}_{336 \text{ nm}}$.

- Saponarétine (C-glu.-6) : $\text{DO}_{270 \text{ nm}}$ $<$ $\text{DO}_{336 \text{ nm}}$.

(✱) La saponarétine, appelée alors "homovitexine" a été obtenue en petite quantité lors de l'extraction de la vitexine par Perkin.

C-glucosyl-chrysoériols

- Scoparine (C-glu. -8) : $\text{DO}_{268 \text{ nm}} < \text{DO}_{345 \text{ nm}}$.
 $\text{DO}_{252 \text{ nm}} < \text{DO}_{268 \text{ nm}}$.
- Isoscoparine (C-glu. -6) : $\text{DO}_{270 \text{ nm}} > \text{DO}_{348 \text{ nm}}$.
 $\text{DO}_{252 \text{ nm}} < \text{DO}_{270 \text{ nm}}$.

CHAPITRE IV

Résultats taxinomiques

IV - 1. PROBLEMES TAXINOMIQUES POSES PAR LES FLUVIALES

IV - 1. 1. Définition des Fluviales

Les Fluviales (ou Hélobiées) rassemblent, comme leur nom l'indique, un certain nombre de végétaux typiquement aquatiques ; depuis BENTHAM et HOOKER (67), en 1883, le contenu de l'ordre (ou super-ordre suivant les auteurs) est presque unanimement reconnu. En effet, les modifications qu'apporteront successivement WETTSTEIN (68), TAKHTAJAN (69), HUTCHINSON (70), EMBERGER (71) et ECKARDT (Engler's Syllabus) (72) sont mineures et consistent le plus souvent à élever telle ou telle tribu, reconnue par BENTHAM et HOOKER, au rang de famille autonome.

En fait, BENTHAM et HOOKER subdivisent les Fluviales en 14 tribus et TAKHTAJAN en 18 familles (nous avons remarqué que la classification de ce dernier reflète un profil moyen des diverses tendances). Pour limiter la discussion aux espèces ici étudiées, nous avons marqué d'un signe particulier (\$) les 8 tribus de BENTHAM et HOOKER et les 10 familles de TAKHTAJAN auxquelles se rattachent nos échantillons végétaux (voir tableau page suivante).

Nous n'avons effectivement analysé que 13 genres de Fluviales (sur environ 40, dont seulement 16 sont présents en France), répartis comme suit :

- Butomus (fam : Butomacées) ;
- Limnocharis (fam : Limnocharitacées) ;
- Alisma, Sagittaria et Echinodorus (fam. : Alismatacées) ;
- Stratiotes et Hydrocharis (fam : Hydrocharitacées) ;
- Elodea (fam. : Halophilacées) ;
- Triglochin (fam. : Juncaginacées) ;
- Zostera (fam. : Zostéracées) ;
- Potamogeton (fam. : Potamogetonacées) ;
- Ruppia (fam. : Ruppiacées) ;
- Zannichellia (fam. : Zannichelliacées).

(Remarque : Les familles citées ci-dessus se réfèrent à la classification de TAKHTAJAN).

Les différentes familles rassemblées comme Fluviales présentent, outre le milieu aquatique commun, plusieurs caractères anatomiques ou morphologiques, faisant ressortir l'homogénéité du groupe, malgré la diversité de l'organisation et la disposition florale : la structure du gynécée, le mode de formation du pollen et de l'albumen (de type "hélobial"), la nature de la graine sont en effet uniformes chez les diverses familles ; de plus, les représentants des Fluviales montrent "une anatomie classique (à la fois) de Monocotylédones et de plantes aquatiques (appareil conducteur réduit, lacunes...)" (EMBERGER, p. 992).

IV - 1. 2. Problèmes internes

Les affinités des diverses familles sont souvent très étroites, si bien que les opinions des systématiciens diffèrent quant à leur répartition en deux ou plusieurs ordres ou super-ordres.

BENTHAM - HOOKER (1883)	WETTSTEIN (1935)	HUTCHINSON (1959)	TAKHTAJAN (1959)	EMBERGER (1960)	ECKARDT (Engler's)
Ordre : <u>Hydrocharidées</u>	Fam : <u>Hydrocharidées</u>	Ordre : <u>Butomales</u>	Ordre : <u>Hydrocharitales</u>	Ordre : <u>Alismatales</u>	ss-ordre : <u>Alismatinées</u> (incl. Butomines pp)
Tribu : Hydrillées \$	ss-fam : Stratiotoïdées	Fam : Butomacées	Fam : Hydrocharitacées \$	Fam : Butomacées	Alismatacées Alisma
" Vallisnériées	" Vallisnérioidées	" Hydrocharitacées	" Thalassiacées \$	" Hydrocharitacées	Echinodorus Sagittaria
" Stratiotées \$	" Halophiloidées	"	" Halophilacées	" Alismatacées	Butomacées Butomus
" Thalassées	" Thalassioïdées			" Juncaginacées	Limncharis
				" Scheuchzériacées	
				" Aponogétonacées	
Ordre : <u>Alismacées</u>	Fam : <u>Alismatacées</u>	Ordre : <u>Alismatales</u>	Ordre : <u>Alismatales</u>		ss-ordre : <u>Hydrocharitines</u>
Tribu : Alismées \$	Fam : Butomacées	Fam : Alismatacées	Fam : Butomacées \$		Hydrocharitacées
" Butomées \$	Fam : Scheuchzériacées (=Juncaginacées)	" Scheuchzériacées	" Limncharitacées \$		Hydrocharis
			Alismatacées \$		Stratiotes
					Elodea
		Ordre : <u>Triuridales</u>	Ordre : <u>Potamogetonales</u>	Ordre : <u>Potamogetonales</u>	ss-ordre : <u>Scheuchzériinées</u>
	Fam : Triuridacées	Fam : Triuridacées	Fam : Scheuchzériacées \$		Scheuchzériacées
	Ordre : <u>Juncaginales</u>	Ordre : <u>Juncaginales</u>	Juncaginacées \$	Fam : Potamogetonacées	
	Juncaginacées	Juncaginacées	Lilaeacées \$	Ruppiacées	
	Posidoniacées	Posidoniacées		Lilaeacées	
Ordre : <u>Najadacées</u>	Ordre : <u>Aponogétonales</u>	Ordre : <u>Aponogétonales</u>			ss-ordre : <u>Potamogetoninées</u>
Tribu : Juncaginées \$	Fam : Aponogétonacées	Aponogétonacées	Aponogétonacées	Zostéracées	Aponogétonacées
" Aponogétonées \$	Fam : Potamogetonacées				
Potamées Potgées \$	Potamogeton	Zostéracées	Zostéracées \$	Posidoniacées	Juncagingacées (incl. Lilaeacées)
Posidoniées	Cymodocea	Ordre : <u>Potamogetonales</u>	Potamogetonacées \$	Potamogetonacées	Potamogeton
Zannichelliées \$	Zannichellia	Potamogetonacées	Ruppiacées \$	Zannichelliacées	Ruppia
Zostérées \$	Ruppia	Ruppiacées	Zannichelliacées \$	Najadacées	Zostera
Naiadées	Zostera	Ordre : <u>Najadales</u>	Cymodocées		Zannichelliacées
Cymodocées	Posidonia	Zannichelliacées	Najadacées		Najadacées
	Fam : Najadacées	Najadacées		Ordre annexe : <u>Triuridales</u>	
	(Annexe : Triuridacées)		Ordre : <u>Triuridales</u>		
			Fam. : Triuridacées		

Pour TAKHTAJAN (1959), il existerait 4 ordres à l'intérieur du super-ordre des Fluviales :

- ordre des Alismatales, comprenant 3 familles (Butomacées, Limnocharitacées, Alismatacées) ;
- ordre des Hydrocharitales, comprenant 3 familles (Hydrocharitacées, Thalassiacées, Halophilacées) ;
- ordre des Potamogetonales, renfermant 11 familles (Scheuchzériacées, Juncaginacées, Lilaeacées, Aponogétonacées, Posidoniacées, Zostéracées, Potamogetonacées, Ruppiacées, Zannichelliacées, Cymodocées, Najadacées) ;
- ordre des Triuridales, avec une famille.

ECKARDT (Engler's Syllabus, 1964), pour qui les Fluviales deviennent un ordre, y distingue 4 sous-ordres :

- sous-ordre des Alismatinées (incl. Butominées p.p.) :
 - famille des Alismatacées ;
 - famille des Butomacées ;
- sous-ordre des Hydrocharitinées :
 - famille des Hydrocharitacées ;
- sous-ordre des Scheuchzériinées :
 - famille des Scheuchzériacées ;
- sous-ordre des Potamogetoninées :
 - famille des Juncaginacées (incl. Lilaeacées) ;
 - famille des Potamogetonacées (incl. Ruppiacées et Zostéracées)
 - famille des Zannichelliacées ;
 - famille des Najadacées.

HUTCHINSON (1959) pousse plus loin encore le démembrement puisque les Fluviales se trouvent subdivisées en 7 ordres dans le groupe des Calicifères :

- ordre des Butomales (Butomacées, Hydrocharitacées) ;
- ordre des Alismatales (Alismatacées, Scheuchzériacées, Pétrosaviacées) ;
- ordre des Triuridales (Triuridacées) ;
- ordre des Juncaginales (Juncaginacées, Lilaeacées, Posidoniacées) ;
- ordre des Aponogétonales (Aponogétonacées, Zostéracées) ;
- ordre des Potamogetonales (Potamogetonacées, Ruppiacées) ;
- ordre des Najadales (Zannichelliacées, Najadacées).

Enfin, EMBERGER (1960), se basant, comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, sur l'origine des carpelles et la différence des types de placentation, ne reconnaît que deux ordres :

- ordre des Alismatales, comportant 6 familles (Butomacées, Hydrocharitacées, Alismatacées, Juncaginacées, Scheuchzériacées, Aponogétonacées) ;
- ordre des Potamogetonales, formé de 7 familles (Potamogetonacées, Ruppiacées, Lilaeacées, Zostéracées, Posidoniacées, Zannichelliacées, Najadacées).

Comparons maintenant les points de vue de TAKHTAJAN et de ECKARDT (Engler's Syllabus). En mettant à part les Scheuchzériinées de ECKHARDT et les Triuridales de TAKHTAJAN, chacun de ces deux auteurs a rassemblé pratiquement les mêmes familles :

- en 3 sous-ordres pour ECKARDT, pour qui les Hélobiées (=Alismatales) sont un ordre ;
- en 3 ordres pour TAKHTAJAN qui élève les Hélobiées au rang de super-ordre.

C'est ce que nous retrouvons dans la première classification retenue, celle de BENTHAM et HOOKER (1883).

A côté de ces trois classifications très semblables, nous relevons donc des conceptions extrêmes :

- celles de WETTSTEIN (1935) puis de HUTCHINSON (1959), qui répartissent les différents genres de ces Monocotylédones aquatiques en 7 familles (WETTSTEIN) ou 7 ordres (HUTCHINSON) ;
- celle de EMBERGER (1960) qui ne reconnaît que 2 ordres dans le "phylum" des Hélobiées (=Fluviales).

Nous essaierons donc d'interpréter nos résultats biochimiques à la lumière de ces données systématiques ; mais auparavant nous voudrions indiquer quelques parentés des Fluviales avec d'autres groupes végétaux.

IV - 1. 3. Relations des Fluviales avec les ordres voisins

a) Relations avec d'autres Monocotylédones

..... Selon TAKHTAJAN, les Hélobiées voisinent avec les super-ordres suivants :

- Liliiflores (Liliales, Broméiales, Iridales, Dioscoréales, Zingibérales, Haemodorales, Orchidales) ;
- Junciflores (Junciales, Cypérales) (*) ;
- Farinosées (Commélinales, Eriocaulales, Restionales, Poales = Graminales) ;
- Spadiciflores (Palmales, Cyclanthales, Arales, Pandanales).

Par ailleurs, du point de vue morphologique, EMBERGER souligne que :

- "l'inflorescence des Butomacées rappelle les Amaryllidacées et certaines Liliacées, le pollen de Butomus ressemblant à celui de certaines Liliacées" ;
- "l'organisation florale des Potamogetonales est remarquable par les inflorescences généralement en épis, évoquant le spadice des Arales... A bien des points de vue, l'organisation florale des Potamogetonales est très archaïque, la plus archaïque parfois de toutes les Monocotylédones" ;
- "Les Potamogetonacées et les Zostéracées ont des ressemblances avec les Spadiciflores en général".

b) Relations avec des Dicotylédones

..... EMBERGER, à ce propos, évoque la parenté entre Fluviales et Polycarpiques (Nymphaeacées, Renonculacées, Cératophyllacées) ; les ressemblances sont surtout marquées entre Alismatales et Renonculacées. Signalons, pour appuyer ceci, qu'un genre d'Alismatacées a reçu le nom de Ranalisma à cause de sa grande ressemblance avec une Renoncule.

Pour TAKHTAJAN, appartiennent aussi aux Polycarpiques les Pipérales, placées chez cet auteur à côté des Nymphaeales et des Nelumbolales (chez ENGLER, les Pipérales suivent les Ranunculales).

Dès 1911, LOTSY (73) a comparé le développement de la graine de Peperomia à celui d'une Aracée, et l'embryon de Pipéracée à celui d'Alisma.

Des considérations analogues ont sans doute poussé EMBERGER à inclure les Pipérales dans le même phylum que les Spadiciflores, c'est à dire, par exemple, à côté des Arales et des Palmales.

Finalement le problème de la situation des Pipérales n'est pas totalement résolu. Aussi pour essayer de trouver des parentés biochimiques entre les Fluviales et les différentes familles à propos desquelles les auteurs ont évoqué des parentés botaniques, avons-nous "débordé" légèrement l'ordre des Fluviales, en étudiant le contenu flavonique d'une Cératophyllacée, celui de quelques Nymphéacées "primitives", ainsi que celui d'un Arum et de deux Piper.

L'ensemble des résultats biochimiques concernant les Fluviales et les espèces étrangères à l'ordre est résumé dans le tableau suivant, d'où nous tenterons de faire ressortir quelques caractères généraux.

IV - 2. RESULTATS FLAVONIQUES

IV - 2. 1. Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-après.

(*) Les ordres comportant une majorité d'espèces hygrophiles sont soulignés.

ORDRE, FAMILLE, ESPECE	AGLYCONES (éther)			LEUCOANTHOCYANES (butanol)			C-GLYCOSYLFLAVONES (butanol)						
	dosage	1	2	3	dosage	4	5	6	dosage	7	8	9	10
FLUVIALES													
BUTOMACEES													
<u>Butomus umbellatus</u> L.	O, 4 (426)	-	-	Flol (O, 31)	1, 6 (540)	+	-	-	2, 5 (350)	H. O.	-	V	-
<u>Limnocharis plumieri</u> Rich.	O, 05 (430)	-	-	Flols ?		-	-	-	8 (342)	H. O.		V. Sa.	
HYDROCHARITACEES													
<u>Hydrocharis morsus-ranae</u> L.	O, 1 (435)	-	-	Flol (O, 45)	2 (545)	+	-	-	1, 5 ? (350)	-	-	-	-
<u>Elodea canadensis</u> Rich.	2 (414)	L ; C	-	-	O, 5 (546)	-	-	Pa pe, la	5 (354)	-	-	-	2C-gf
<u>Statotes aloides</u> L.	O, 3 (400)	(L, C)	-	-	1 (553)	+	-	-	O, 8 (345)	-	-	-	-
ALISMATACEES													
<u>Alisma plantago</u> L.	1 (427)	-	-	Flol inst. ?					10 (345)	H. O	S. I.	-	-
<u>Sagittaria sagittifolia</u> L.	O, 6 (382)	(A ?)		Au ?					25 (350)	H. O	S. I.	-	C-gf
<u>Sagittaria montevidensis</u> Cham. et Schlecht	O, 4 (423)	-	(?)	-					34 (345)	H. O	-	-	C-gf
<u>Echinodorus muricatus</u> Gris.	O, 5 (420)	-	-	-					15 (350)	H. O	S. I.	-	+ Cy ?
JUNCAGINACEES													
<u>Triglochin palustris</u> L.	1 (400)	L, C, D. Ap ?	-	-					9 (350)	-	-	-	2C-gf ?
<u>Triglochin maritimum</u> L.	non dosé	?	-	-					non dosé	-	-	-	-

	AGLYCONES (éther)			LEUCOANTHOCYANES (butanol)			C-GLYCOSYLFLAVONES (butanol)						
	dosage	1	2	3	dosage	4	5	6	dosage	7	8	9	10
POTAMOGETONACEES													
<u>Potamogeton natans</u> L.	1, 7 (400)	L, C.	-	-					26 (350)	H. O.	S. I.	-	X ₁ , X ₂
<u>Potamogeton densus</u> L.	O, 1 (402)	L _{(A)}} ^{C, D}	-	-					9 (350)	-	-	-	C _{gl}
<u>Potamogeton fluitans</u> Roth.	1, 5 (408)	L?	-	-					8 (340)	H. O.	-	-	+ 2C _{gl}
<u>Potamogeton crispus</u> L. var. <u>serrulatus</u> Schrad.	O, 7 (423)	L?	-	-					3, 5 (330)	-	-	-	-
<u>Potamogeton obtusifolius</u> M. et K.	1 (410)	-	-	-					2 (330)	-	-	-	-
<u>Potamogeton perfoliatus</u> L.	1, 9 (412)	L?	-	-					3, 5 (350)	-	-	-	-
<u>Potamogeton lucens</u> L.	O, 2 (425)	-	-	-					4 (350)	H. O.	-	-	-
<u>Potamogeton pectinatus</u> L.	O, 3 (392)	L?	-	-					8 (333)	H. O. ?			+ 2C _{gl}
ZOSTERACEES													
<u>Zostera angustifolia</u> Hornem.	5, 3 (400)	L _{(A)}} ^{C, D}	-	-					6 (350)	-	-	-	-
<u>Zostera marina</u> L.	5, 3 (398)	L _{(A)}} ^{C, D}	-	-					5 (350)	-	-	-	-
RUPPIACEES													
<u>Ruppia maritima</u> L.	O, 4 (400)	L?, C	-	-				1 (530)	O, 9 (350)	-	-	-	-
ZANNICHELLIACEES													
<u>Zannichellia palustris</u> L.	6, 3 (380)	L _{(A)}} ^{C, D}	-	-					6 (350)	-	-	-	-

98

ORDRE, FAMILLE, ESPECE	AGLYCONES (��ther)			LEUCOANTHOCYANES (butanol)			C-GLYCOSYLFLAVONES (butanol)						
	dosage	1	2	3	dosage	4	5	6	dosage	7	8	9	10
AUTRES MONOCOTYLEDONES													
ARACEES													
<u>Arum italicum</u> Mill.	O, 4 (425)	L, (C ou A ?)	-	-	-	-	-	-	8 (345)	H. O.	-	V. Sa	2 Cgf
DICOTYLEDONES													
NYMPHAEACEES													
<u>Cabomba caroliniana</u> A. Gray	O, 2 (390)	-	-	Flol(O, 3)					6 (350)	O.	-	V. Sa	Vi.
<u>Nelumbo nucifera</u> Gaertn	O, 6 (428)	-	Q, K	-	8 (551)	+	+			-	-	-	-
<u>Nymphaea zanzibariensis</u> Casp.	1, 2 (420)	-	Q	E.	2 (542)	+	+			-	-	-	-
GERATOPHYLLACEES													
<u>Ceratophyllum</u> sp.	O, 5 (397)				3, 12 (552)	+	+			-	-	-	-
PIPERACEES													
<u>Piper nigrum</u> L.	O, 25 (424)	A ou C ?	Q	-	O, 12 (540)	(+)	-	-	1 (330)	-	-	-	2C-gc 3C-gf ⁺
<u>Piper auritum</u> H.B. et K. var. <u>amplifolium</u> C.C.	1 (424)	A ou C ?	-	-	O, O5 (540)	(+)	-	-	O, 3 ? (344)				3C-gf

Remarques (✱) Anthocyanes préexistantes

LEGENDE

Entre parenthèses, est indiquée chaque fois la longueur d'onde (en nm) du maximum d'absorption.

AGLYCONES

Dosage global phase éther, en présence d'AlCl₃ ; résultats en % PS (✕)

1 = Flavones : L (lutéoline) ; C (chrysoériol) ; D (diosmétine) ; A (apigénine).

2 = Flavonols : K (kaempférol) ; Q (quercétine).

3 = Autres : E (acide ellagique) ; Au (aurones) ; Flol (flavonols non identifiés, dont on indique le Rf dans l'acide acétique 60%).

LEUCOANTHOCYANES

Dosage global phase butanol, vers 550 nm ; résultats en % PS (✕)

4 = Leucocyanidine

5 = Leucodelphinidine

6 = Autres : Pa (paeonidine) ; Pe (pétunidine) ; La (leucoanthocyanes non identifiées),

C-GLYCOSYLFLAVONES

Dosage global phase butanol, vers 330 - 350 nm ; résultats en % PS (✕)

7 = C-glucosyllutéolines : O (orientine) ; H (homoorientine)

8 = C-glucosylchrysoériols : S (scoparine) ; I (isoscoparine)

9 = C-glucosylapigénines : V (vitexine) ; Sa (saponarétine)

10 = Autres : Vi (vicénines) ; C-gl (C-glucosyllutéolines, non identifiées) ; C-gc (C-glucosylchrysoériols ; non identifiées) ; C-gf (C-glucosylflavones, non identifiées) ; C (cytisine) ; X₁ et X₂ (C-glucosyllutéoline et chrysoériol du Potamot).

(✕) sauf pour Arum et les 2 Piper où ils sont en % PF).

IV - 2. 2. Commentaires

De ces résultats, nous allons tenter de tirer divers enseignements chimiotaxinomiques :

- définition flavonique des Fluviales ;
- définition flavonique des différentes familles constitutives de l'ordre.
- rapprochements avec d'autres taxons.

IV - 2. 2. 1. Définition flavonique des Fluviales

Le profil flavonique moyen des Fluviales est le suivant :

- Leucoanthocyanes : présentes dans 5 espèces sur 23, soit environ 20% des espèces ; la leucocyanidine y est alors toujours présente, et la leucodelphinidine toujours absente (de même que l'acide ellagique et la myricétine) ;
- Flavonols : présents dans 4 espèces, soit environ 15% de celles-ci ;
- Flavones : présentes dans 14 espèces, soit environ 60% ;
- C-glycoflavones : présentes dans 12 espèces sur 23, soit environ 50% des espèces.

En d'autres termes, compte-tenu des données générales de BATE-SMITH (voir ci-dessous), le phylum des Fluviales se caractérise par :

- sa richesse en flavones et C-glycoflavones ;
- sa pauvreté en flavonols et leucoanthocyanes ;

- l'absence totale de dérivés phényltrihydroxylés.

Le même processus, appliqué au niveau de chaque famille, donne comme nous allons le voir, des résultats un peu plus nuancés.

IV - 2. 2. 2 Définition flavonique des familles

Nous suivrons pour cela la systématique d'EMBERGER.

BUTOMACEES

Les deux genres étudiés : Butomus et Limnocharis, ont un chimisme très proche en ce qui concerne les C-glycoflavones et les flavonols ; la seule différence réside dans la présence de leucoanthocyanes chez Butomus. Il ne semble pas toutefois que cette dernière particularité puisse justifier la distinction d'une famille autonome des Limnocharitacées.

HYDROCHARITACEES

Elles se rapprochent du genre Butomus par la présence uniforme de leucoanthocyanes. Par contre, elles se distinguent des Butomacées par leur plus grande richesse en flavones et la plus grande pauvreté en C-glycoflavones.

ALISMATACEES

Les quatre espèces étudiées ont une définition flavonique très homogène :

- absence de flavones (à l'exception discutable de Sagittaria sagittifolia) ;
- absence générale de leucoanthocyanes ;
- présence uniforme de C-glycoflavones, en quantités assez importantes.

JUNCAGINACEES

De cette famille, représentée ici seulement par deux espèces dont une seule a pu être étudiée plus à fond, ressortent les caractères suivants :

- présence de flavones (sans doute dans les deux espèces) ;
- présence de C-glycosylflavones non identifiées (?).

POTAMOGETONACEES

Cette famille est représentée ici par un seul genre : Potamogeton, rassemblant un grand nombre d'espèces ayant en commun l'absence de leucoanthocyanes et de flavonols. Des flavones et des C-glycoflavones sont abondantes chez Potamogeton natans, P. fluitans, P. lucens, P. densus et P. pectinatus (espèces à feuilles pétiolées, généralement larges et flottantes), alors que seules de faibles quantités de flavones sensu lato sont décelables chez Potamogeton crispus var. serrulatus, P. obtusifolius, et P. perfoliatus (espèces à feuilles non pétiolées, plutôt petites et immergées).

RUPPIACEES

L'espèce Ruppia maritima est la seule étudiée ; elle se distingue des Potamogetonacées par :

- la présence de leucoanthocyanes (leucocyanidine) ;
- l'absence de C-glycoflavones ;
- elle renferme, par contre, des flavones.

ZOSTERACEES

Un seul caractère très net rassemble les deux espèces : la grande abondance de flavones ; cette dernière explique peut-être aussi les résultats du dosage global de la phase butanolique d'hydrolyse, puisqu'aucune C-glycoflavone n'y a été mise en évidence par chromatographie. A ce titre, les Zostéracées se rapprochent des Juncaginacées.

ZANNICHELLIACEES

Le seul représentant de cette famille contient une forte proportion de flavones aglycones après hydrolyse. Comme dans le cas des Zostéracées, celle-ci justifie peut-être la forte teneur en composés absorbant vers 350 nm dans la phase butanolique d'hydrolyse.

Nous n'avons pu mettre en évidence ni leucoanthocyanes ni C-glycoflavones.

IV - 2. 2. 3. Rapprochements avec d'autres taxons

Dans le but d'éprouver divers rapprochements tentés par quelques botanistes, nous avons analysé un Arum, Monocotylédone typique à laquelle nous avons adjoint deux Pipéracées, (TAKHTAJAN, page 181 ; EMBERGER, page 1021 ; LOTSY, page 502). Les résultats obtenus, portés

dans le tableau général, peuvent se résumer comme suit :

- Arum italicum Mill.(*) est une espèce riche à la fois en flavones et C-glycoflavones ;
- Piper nigrum L. et Piper auritum HB. et K. var. amplifolium DC. renferment une très faible quantité de (leuco) cyanidine, mais aussi une très faible quantité de C-glycoflavones ; enfin Piper nigrum contient beaucoup de quercétine après hydrolyse, accompagnée d'une flavone qui pourrait être l'apigénine.

Poursuivant au delà des Pipéracées, nous avons envisagé d'autres Dicotylédones dont l'anatomie et l'habitat offrent quelques similitudes avec les Fluviales.

Nous avons également été guidée pour ceci par les remarques d'EMBERGER (p. 971) pour qui "les Nymphaeacées ont beaucoup de caractères de "Monocotylédones", tels que la structure pseudocoenocarpique de l'ovaire (Hydrocharitacées), la caducité de la racine primaire, l'anatomie, la placentation, l'ovule unique des Nelumbo comme chez les Potamogétonacées, ... et les réactions sérologiques positives entre "Monocotylédones" et Nymphaeacées"...

Le même auteur ajoute encore :

- que les "Cabombacées évoquent les Hélobiées encore plus que les Nymphaeacées"... (p. 970) ;
- que "Nymphaeacées et Cératophyllacées sont des Dicotylédones à un seul cotylédon, résultant soit d'une syncotylie soit de l'avortement de l'un des deux".

Des résultats formulés dans le tableau en IV. 2. 1., se dégagent les caractères suivants :

- une seule espèce (Ceratophyllum) contient des flavones peu abondantes ;
- deux autres (Nelumbo nucifera et Nymphaea zanzibariensis) contiennent des flavonols ;
- deux espèces renferment des leucoanthocyanes (leucodelphinidine et leucocyanidine) ; ce sont Nelumbo nucifera et Nymphaea zanzibariensis ;
- Cabomba caroliniana contient des C-glycoflavones ;
- enfin Nymphaea zanzibariensis possède de l'acide ellagique.

IV - 3. DISCUSSION DES RESULTATS

IV - 3. 1. A l'intérieur des Fluviales

Compte-tenu de la définition biochimique, formulée en IV - 2. 2. (richesse en flavones et C-glycoflavones ; rareté des leucoanthocyanes et des flavonols), nous pouvons disposer les différentes familles du phylum (EMBERGER) ou super-ordre (TAKHTAJAN) des Hélobiées d'après la séquence suivante :

	Leucoanthocyanes	C-glycoflavones	Flavones	Flavonols
Hydrocharitacées	++	(+)	+	+
Butomacées (**)	(+)	+	-	+
Alismatacées	-	++	-	+
Juncaginacées	-	+	++	-
Zostéracées	-	?	++	-
Potamogétonacées	-	++	++	-
Ruppiacées	(+)	?	+	-
Zannichelliacées	-	?	++	-

(*) BATE-SMITH (1968) (76) indique qu'Arum maculatum L. contient du kaempférol, alors que nous n'avons trouvé aucune trace de flavonol dans Arum italicum ; par contre dès 1956, PHOUPHAS (75) avait identifié la saponarine chez Arum italicum et Biarum tenuifolium Schott.

(**) Dans la mesure où Butomus umbellatus et Limncharis plumieri présentent un contenu flavonique très voisin, à l'exception de très faibles quantités de leucocyanidine dans la première espèce, nous ne jugeons pas opportun de démembrer les Butomacées d'EMBERGER au profit de deux familles autonomes comme le propose TAKHTAJAN.

En effet, le chimisme des Butomacées est intermédiaire entre celui des Hydrocharitacées (abondance des flavones et des leucoanthocyanes, pauvreté en C-glycoflavones) et celui des Alismatacées (absence de flavones et absence totale des leucoanthocyanes, présence uniforme des C-glycoflavones). TAKHTAJAN propose de répartir ces trois familles en deux ordres, Hydrocharitales (à ovaire adhérent) et Alismatales (= Butomacées + Alismatacées, à ovaire libre), ce que le critère présence ou absence de flavones semble appuyer ; néanmoins, la présence uniforme de flavonols qui, bien que peu abondants, ne se retrouvent dans aucune autre Hélobiée, ne nous pousse pas à un tel sectionnement. Pour la même raison, les Alismatales d'EMBERGER, regroupant des Butomacées aux Juncaginacées, nous semblent chimiquement hétérogènes.

En fait, si une coupure doit être faite à l'intérieur des Fluviales, nous serions tentée, sur la base des flavonols, (voire des flavones et leucoanthocyanes), de la situer entre Alismatacées et Juncaginacées.

L'ensemble des autres familles, dont nous avons pu analyser au moins un représentant, est contenu, pour TAKHTAJAN, dans l'ordre des Potamogetonales. En effet, nos résultats flavoniques concernant les Juncaginacées rapprochent celles-ci des Zostéracées et des Potamogetonacées, puisqu'elles se caractérisent toutes par la grande abondance de flavones et la présence de C-glycoflavones, en même temps que par l'absence totale de leucoanthocyanes et de flavonols.

Les Zannichelliacées ont un contenu flavonique très proche de celui des Zostéracées, nous permettant de proposer leur classement non loin de celles-ci.

Seule, d'après nos résultats, la famille des Ruppiacées est un peu différente des autres familles de l'ordre des Potamogetonales (présence de leucoanthocyanes chez Ruppia maritima), tout en possédant un caractère commun aux autres Potamogetonales, l'absence de flavonols. Comme dans le cas des Butomacées, que nous ne jugeons pas utile de scinder, l'existence de leucocyjanidine en traces chez Ruppia est sans doute insuffisante pour écarter cette famille des Potamogetonacées, avec lesquelles elle présente des caractères morphologiques assez voisins.

IV - 3. 2. Chez les Monocotylédones (et Dicotylédones) proches

Nous retiendrons ici non seulement les divers ordres classiquement reconnus comme constitutifs de la classe des Monocotylédones, mais aussi les quelques familles de Dicotylédones dont EMBERGER a signalé les parentés avec les Fluviales.

Il est assez intéressant de constater combien la parenté reconnue à quelques titres au niveau de l'anatomie et de la morphologie est loin d'être contredite par la composition flavonique. Ainsi le contenu des Aracées (et Lemnacées) est très proche de celui des Potamogetonacées par la présence de C-glycoflavones, de flavones *sensu stricto*, et l'absence de leucoanthocyanes et de flavonols. Certaines analogies ont d'ailleurs été reconnues entre Aracées et Lemnacées par les Botanistes classiques (comme le rappelle entre autres EMBERGER, page 1030, les Lemnacées seraient des Aracées très réduites).

Les Pipéracées s'écartent un peu du schéma précédent ; également présentes, les C-glycoflavones sont toutefois peu abondantes et accompagnées de leucoanthocyanes (faibles teneurs néanmoins) et, pour une espèce, du flavonol quercétine. A ce titre, les Pipéracées pourraient être rapprochées des Hydrocharitacées et des Alismatacées (c'est à dire des Alismatales de EMBERGER), alors que du point de vue morphologie externe, les Piper ont une inflorescence rappelant celle des Potamots ; leur caractère de "Monocotylédones" sur le phylum Pipérales-Spadiciflores, proche des Hélobiées, est donc soutenable du point de vue biochimique.

Chez les Dicotylédones (aquatiques), Cabomba est suffisamment riche en C-glycoflavones pour être également rapprochée des Fluviales au plan biochimique. Le cas de Ceratophyllum (flavones seulement et leucoanthocyanes) est plus douteux. Quant à Nelumbo et Nymphaea, l'absence de flavones *sensu lato* et la présence de flavonols et de leucoanthocyanes (et d'acide ellagique (✕) chez Nymphaea) les écartent résolument des Fluviales et autres Monocotylédones.

Si nous envisageons maintenant les autres Monocotylédones (voir tableau en IV - 3. 3.), les ordres biochimiquement proches des Fluviales sont, outre les Spathiflorales

(✕) BATE-SMITH (76) a signalé que l'acide ellagique, assez fréquent chez les Dicotylédones (Ranales exceptées), est totalement absent des Monocotylédones ; VOIRIN (14) a signalé également l'absence de ce composé chez les Ptéridophytes.

(Aracées + Lemnacées) déjà signalées, les Cypéales et surtout les Graminales. Assez éloignées par contre sont les Pandanales, les Microspermales (Orchidées) et les Scitaminales (faiblesse des flavones sensu lato, richesse des flavonols, voire des leucoanthocyanes).

IV - 3. 3. Au sein des Angiospermes

IV - 3. 3. 1. Caractères flavoniques en général

Afin d'envisager ultérieurement les influences respectives de la position systématique, de l'habitus (ligneux ou herbacé) et de l'habitat (terrestre ou aquatique) sur la composition flavonique, il nous a paru utile d'étendre la discussion à l'ensemble des Angiospermes.

La documentation relative aux Dicotylédones est bien connue dans ses grandes lignes depuis près de 10 ans ; nous la résumons ci-dessous. Par contre, celle concernant les Monocotylédones est plus restreinte et nous avons dû, dans ce but, nous livrer à une compilation essentiellement basée sur les travaux de BATE-SMITH et HARBORNE.

A partir de l'analyse d'un millier de Dicotylédones (77), BATE-SMITH (78) a dégagé le profil flavonique suivant :

- 40% des espèces possèdent des leucoanthocyanes ;
- 72% des espèces contiennent des flavonols ;
- moins de 10% contiennent des flavones.

A partir de telles données et de divers autres travaux (BATE-SMITH, 1956, 1962, 1965 ; HARBORNE, 1966a, 1967 ; LEBRETON, 1962, 1963), ont été dégagés les "principes évolutifs suivants" :

- sont considérés comme caractères primitifs :
 - la présence de leucoanthocyanes,
 - celle de flavonols ;
 - celle de dérivés phényltrihydroxylés (leucodelphinidine, acide ellagique, myricétine) ;
 - celle de dérivés C-substitués (C-méthyle, C-glycoside (*), biflavone) ;
- sont considérés par contre comme caractères évolués :
 - l'hydroxylation en position 6 ou 8,
 - l'hydroxylation en position 2',
 - la O-méthylation,
 - l'absence des leucoanthocyanes,
 - l'absence des flavonols, remplacés par des flavones,
 - l'absence des dérivés phényltrihydroxylés.

Soulignons que ces critères ont été définis essentiellement à partir des Dicotylédones.

BATE-SMITH a souligné aussi que la présence de leucoanthocyanes et de flavonols est liée à l'habitus ligneux tandis que les flavones sont plus fréquentes chez les plantes herbacées.

De plus, d'une manière générale, il semble que "l'évolution flavonique va dans le sens d'une oxydation croissante de l'hétérocycle flavonique et d'une disparition des hydroxyles phénoliques libres" (LEBRETON, 1962).

Pour les Monocotylédones, la compilation des résultats phytochimiques permet de fournir les données suivantes (d'après 420 espèces analysées par BATE-SMITH (76) en 1968) :

- 23% des espèces contiennent des leucoanthocyanes ;
- 45% des espèces contiennent des flavonols.

Il y a donc une moindre richesse en leucoanthocyanes et flavonols chez les Monocotylédones, ce qui peut être mis en relation avec la forte majorité d'espèces herbacées de cette classe.

Inversement, mais sans pouvoir préciser davantage, les flavones sont plus abondantes (environ 20%) chez les Monocotylédones, ce caractère "évolué" (ou herbacé?) se doublant également d'une grande pauvreté en composés phényltrihydroxylés (leucodelphinidine et myricétine ;

(*) HARBORNE, 1967, page 313.

l'acide ellagique est totalement absent).

Une analyse plus serrée de la bibliographie conduit au tableau suivant :

	Leucoanthocyanes	Flavonols	Flavones	C-glycoflavones
FLUVIALES	+	+	+++	+++
LILIIFLORALES	++	+++	{+++ (Iris)	{+++ (Iris)
JUNCALES	+	+	{- (Crocus)	{+++ (Crocus)
COMMELINALES	+++	++	+++	+
GRAMINALES	+	+	+++	+++
PRINCIPES	+++	+	+++	+++
SPATHIFLORALES	++	++	+++	+++
PANDANALES	++	+++		
CYPERALES	++	++	++	+++
SCITAMINALES	+++	++	+	
MICROSPERMALES	+	+		
SYNANTHEES	-	-		
FARINOSEES	++	++	+	
Monocotylédones	23%	45%	env. 20%	% ?
en général				

Légende : - 0%

+ 1 à 25%

++ 25 à 50%

+++ 50 à 100%.

Fréquence chez les diverses espèces.

Les leucoanthocyanes ne sont vraiment absentes que des Synanthées ; mais leur présence ne devient la règle que chez les Principes (= Palmées), les Commélinales et les Scitaminales qui groupent, notons-le, la plupart des Monocotylédones "ligneuses" ou, du moins, arborescentes, (Palmiers, Bananiers).

Des flavonols sont présents dans tous les ordres, sauf chez les Synanthées, mais en plus ou moins grande quantité. Les ordres les plus riches sont les Liliiflorales et les Pandanales. La myricétine est signalée chez les Iridacées et les Zingibéracées, mais les flavonols sont représentés surtout par quercétine et kaempférol.

Les flavones sont très abondantes dans plusieurs ordres ; elles n'ont pas été signalées chez les Pandanales, les Microspermales et les Synanthées. Enfin, les C-glycosylflavones ont été identifiées dans 7 ordres sur 14, souvent associées, soulignons-le, aux flavones stricto sensu.

Si nous considérons maintenant les Fluviales dans ce nouveau contexte, la fréquence des Leucoanthocyanes (environ 20%) y est très proche de la moyenne des Monocotylédones ; celle des flavonols (environ 15%) est par contre nettement inférieure au profil moyen alors que, corrélativement sans doute, celle des flavones (environ 60%) atteint une valeur remarquablement élevée.

Nous devons envisager maintenant :

- d'une part, la signification chimiotaxinomique des C-glycoflavones en général ; notamment du point de vue évolutif ;
- d'autre part, l'influence éventuelle de l'habitus et de l'habitat, facteurs particulièrement importants pour ce groupe d'Hydrophytes herbacées.

IV - 3. 3. 2. Signification des C-glycoflavones

Jusqu'à une époque récente, la structure et la répartition des C-glycoflavones ayant fait l'objet de travaux peu nombreux, aucune donnée chiffrée concernant leur distribution n'avait pu être énoncée. Dans le but de combler cette lacune, nous avons dressé la liste des diverses Angiospermes (*) à C-glycoflavones en compilant les différents ouvrages et principales revues

(*) La présence de C-glycoflavones dans d'autres sous-embranchements (Mousses, Fougères, Gymnospermes) du Règne Végétal a été volontairement omise, n'intéressant que quelques espèces isolées.

phytochimiques parus de 1963 à nos jours.

1) Répartition botanique des C-glycoflavones

..... Dans les 31 ordres de Dicotylédones répertoriés dans le "Syllabus" de ENGLER, nous avons examiné la répartition de ces composés ; ils sont connus actuellement dans 24 ordres (voir tableau ci-contre).

La longue énumération des différents ordres à C-glycoflavones met assez nettement en évidence leur répartition très large à l'intérieur des Dicotylédones.

Le même inventaire bibliographique a été utilisé pour connaître les représentants de la classe des Monocotylédones où ont été mis en évidence des C-glycosides de flavones (voir tableau ci-contre).

Toujours selon le "Syllabus" de ENGLER, nous relevons des C-glycoflavones dans 7 des 13 principaux ordres.

2) Influence de la position systématique

..... Bien que les résultats portent sur un nombre total d'espèces assez restreint (240 environ), il nous semble possible d'en tirer quelques conclusions.

En effet, les Monocotylédones, d'une part sont moins nombreuses que les Dicotylédones (5 fois moins environ sur un total de 250.000 Angiospermes), d'autre part n'ont certainement pas fait l'objet d'une attention préférentielle de la part des phytochimistes.

Il semble donc que le chiffre de 150 Monocotylédones à C-glycoflavones soit statistiquement significatif par rapport à celui de 85 Dicotylédones à même composés.

Par le même fait il existe donc, d'une part une corrélation positive très nette entre la présence de C-glycoflavones et de flavones (O-glycosides), d'autre part une anti-corrélation tout aussi nette entre la présence de C-glycoflavones et celle de leucoanthocyanes, flavonols et dérivés phényltrihydroxylés, ce que la distribution "fine" au niveau des Fluviales ou même d'autres Monocotylédones permettait déjà d'avancer.

3) Influence de l'habitat et de l'habitus

..... Si le chimisme d'une espèce végétale est à mettre en relation avec sa position systématique, il est également probable que le milieu joue un rôle dans l'expression des potentialités biochimiques, comme cela est reconnu aux niveaux anatomique et morphologique.

Par le fait même, chimisme, habitus et habitat, particulièrement pour les plantes aquatiques, sont interreliés dans une fonction "à variables multiples et dépendantes", dont il est possible ici de discuter seulement les grandes lignes.

En ce qui concerne l'habitat, nous rapporterons tout d'abord quelques données personnelles :
- un examen attentif de la répartition des C-glycoflavones dans le genre Potamogeton nous avait montré que ces composés ne sont présents que dans les espèces à feuilles nageantes ou faiblement immergées ;
- une analyse semi-quantitative des C-glycoflavones dans les trois types de feuilles de Sagittaria sagittifolia (immergées, flottantes, émergées) dont les morphologies respectives sont bien connues, indique une teneur maximale (9%) dans les feuilles nageantes, plus faible (6 et 5%) dans les feuilles aériennes et submergées.

A ce propos, il est à remarquer que l'eau peut jouer à plusieurs titres, directs ou indirects, sur le chimisme flavonique :

- par son rôle "mécanique" de soutien, rendant possible la conquête de la troisième dimension sans appel à la structure ligneuse ; le problème est donc ici posé de l'émergence évolutive accompagnée de (rendue possible par ?) la "découverte" de la lignine. Dans la mesure où lignine et flavonoides ont des précurseurs biochimiques communs de type phényl-propane ou C_6-C_3 , le processus peut évidemment retentir sur le chimisme flavonique.
- par son rôle photochimique d'écran envers les radiations de courte longueur d'onde (UV proche et violet-bleu) du spectre solaire ; nous avons cité les travaux de Mc CLURE (1968) sur le photocontrôle de la biosynthèse des C-glycoflavones chez Spirodela, et l'on sait maintenant, d'une manière générale, que les effets morphogénétiques de la lumière s'exercent généralement au niveau moléculaire.

Liste des ordres d'Angiospermes renfermant des plantes à
C-glycosylflavones

DICOTYLEDONES

FAGALES : Fagacées (Nothofagus).

URTICALES : Ulmacées (Trema aspera, Zelkova).

POLYGONALES : Polygonacées : (Polygonum orientale, Rumex, Fagopyrum).

CENTROSPERMALES : Caryophyllacées (Gypsophila, Silene schafta, Silene conica, Vaccaria,
Saponaria officinalis).

MAGNOLIALES : Lauracées (Beilschmieda).

RANUNCULALES : Renonculacées (Trollius europeus, Adonis vernalis, Ranunculus illyricus,
Ranunculus lingua).

GUTTIFERALES : Théacées (Thea sinensis).

VIOLALES : Violacées (Viola tricolor) ;

Tamarixacées (Tamaris) ;

Passiflorées (Passiflora).

CUCURBITALES : Cucurbitacées (Cucumis melo).

PAPAVERALES : Crucifères (Alliaria officinalis).

MALVALES : Malvacées (Hibiscus).

GERANIALES : Oxalidacées (Oxalis) ;

Linacées (Linum).

TRICOQUES : Euphorbiacées (Jatropha gossypifolia, Croton zambezicus).

RUTALES : Rutacées (Ruta, Citrus dont Citrus lemon, Teclea sudanica).

SAPINDALES : Acéracées (Acer palmatum).

RHAMNALES : Vitacées (Vitis).

ROSALES : Saxifragacées (Bergenia) ;

Rosacées (Crataegus) ;

Légumineuses (21 espèces correspondant à pas moins de 16 genres : Sarothamnus scoparius,
Castanospermum australe, Cytisus scoparius et C. laburnum, Spartium junceum, Aspalathus
linearis, A. acuminatus, Lespedeza capitata, Pueraria, Parkinsonia, Glycyrrhiza glabra,
Desmodium canadense, Crotalaria (5 espèces), Tamarindus, Cassia, Psoralea, Arachis,
Hedysarum).

MYRTALES : Lythracées (Lythrum salicaria) ;

Myrtacées (Eucalyptus) ;

Combrétacées (Combretum micranthum).

OMBELLALES : Ombellifères (3 espèces sur 300 examinées : Laretia acaulis, Cryptotaenia canadensis,
Opoponax chironium).

ERICALES : Ericacées (Vaccinium).

GENTIANALES : Gentianacées (Swertia japonica, Gentiana kochiana, G. verna, G. pneumonanthe,
G. dinarica, G. lutea, G. purpurea, G. punctata, G. campestris). (✱)

TUBIFLORALES : Verbénacées (Vitex lucens et V. littoralis) ;

Solanacées (Gratiola officinalis) ;

Polémoniacées (Phlox drumondii).

RUBIALES : Dipsacacées (Dipsacus, Scabiosa).

SYNANTHERALES : Composées (Tragopogon, Artemisia, Helichrysum, Stachelina dubia).

MONOCOTYLEDONES

FLUVIALES : Alismatacées
Butomacées
Hydrocharitacées
Juncaginacées
Potamogetonacées } (Résultats personnels : 12 espèces)

LILIIFLORALES : Liliacées (Anemarrhena, Ornithogalum) ;
Iridacées (Iris : 12 espèces sur 50 ; Crocus : 35 espèces sur 53) (*).

COMMELINALES : Commélinacées (Commelina).

GRAMINALES : Graminées (Avena, Hordeum, Triticum, Oriza, Briza, Stipa).

PRINCIPES : Palmées (23 taxons sur 35 examinés ; citons comme espèces : Chamaerops humilis,
Howea forsteriana, Oreodoxa regia, Phoenix dactylifera (79).

SPATHIFLORALES : Lemnacées (45) (Spirodela, Lemna, Wolffia : 14 espèces sur 21) ;
Aracées (2 espèces d'Arum, Biarum).

CYPERALES : Cypéracées (34 sur 62 espèces, correspondant à 11 genres). (80)

(*) Iris, cf. BATE-SMITH, 1968 ; Crocus, cf. HARBORNE, 1967.

- par son rôle de "thermostat" par rapport au milieu ambiant ; il est en effet connu (VOIRIN, (14)) que le facteur température est capable d'orienter préférentiellement la biosynthèse vers tel ou tel type de flavonoïde.

A l'intérieur des Monocotylédones, il est possible, à partir des données de la littérature, de rechercher une éventuelle corrélation entre la distribution des C-glycoflavones et l'habitat aquatique. On trouve ainsi 12 Fluviales, 15 Lemnacées, 19 Cypéracées (*), soit un quart des Monocotylédones à C-glycoflavones, présentant, en tout ou partie, un habitat aquatique.

Dans la mesure où cette proportion d'un quart semble supérieure au pourcentage d'Hydrophytes et d'Hélophytes parmi les Monocotylédones en général (bien que les plantes aquatiques soient nettement plus fréquentes chez les Monocotylédones que les Dicotylédones), il semble donc qu'une certaine corrélation existe (chez les Monocotylédones seulement?) entre la présence de C-glycoflavones et l'habitat aquatique, lequel, bien évidemment, favorise (ou est "exigé" par) l'habitus herbacé.

Une autre approche du problème est obtenue en dégagant le profil flavonique des Monocotylédones aquatiques (***) (à partir des résultats de BATE-SMITH, 1968 (76) et des divers travaux de HARBORNE et al (45, 79, 80, 81)); on obtient :

	FLUVIALES	MONOCOTYLEDONES aquatiques (Fluviales comprises)	MONOCOTYLEDONES en général
Leucoanthocyanes	20%	30%	23%
Flavonols	15%	17%	45%
Flavones s.s.	60%	50%	env. 20%
C-glycoflavones	45%	60%	env. 20%

On note donc, chez les Aquatiques (dont les Fluviales) une chute significative des flavonols et une montée tout aussi nette des O- et des C-glycosylflavones.

La part de l'habitus peut être éventuellement appréciée par l'examen des Palmiers (dont HARBORNE, (79), a analysé 35 taxons) :

Leucoanthocyanes : 65% (soit comme chez les Dicotylédones ligneuses) ;

Flavonols : 23% (soit moins que chez les Dicotylédones ligneuses) ;

C-glycoflavones : 65% (soit comme chez les Monocotylédones aquatiques !).

Avant d'aborder une discussion plus générale de la signification des C-glycoflavones, sans doute est-il bon d'envisager également les Dicotylédones à cet égard. Toutefois moins d'informations sont à attendre de cette classe puisque :

- les C-glycoflavones y sont distribuées de manière plus irrégulière, nous l'avons vu ;

- les plantes aquatiques sont plus rares chez les Dicotylédones (1% des espèces?) que chez les Monocotylédones (10%?), ce qui nuit à la validité statistique des calculs de répartition.

Sur les 84 Dicotylédones à C-glycoflavones, une seule est typiquement aquatique : Cabomba caroliniana ; trois autres peuplent des biotopes plus ou moins marécageux :

Lythrum salicaria, Gentiana pneumonanthe, Swertia perennis. Comme chez les Monocotylédones, un certain enrichissement en C-glycoflavones par l'habitat aquatique est-il soutenable ?

De plus, en considérant la composition flavonique générale des Dicotylédones aquatiques (10 espèces sur les 1000 analysées par BATE-SMITH en 1962 ; 10 espèces sur plusieurs centaines analysées dans le laboratoire de Phytochimie), les chiffres suivants sont obtenus :

Leucoanthocyanes : 8 (40%) ;

Flavonols : 13 (65%) ;

Flavones : 4 (8%) ;

C-glycoflavones : 2 (4%).

(*) Dans le genre Carex, dont 19 espèces hygrophiles (mais non franchement aquatiques) et 10 espèces de milieu franchement terrestre ont été analysées (80), il n'y a aucune corrélation entre ce caractère et la présence des C-glycoflavones notées indifféremment dans 70% environ des espèces. Mais ici le niveau microsystematique l'emporte peut-être sur les autres variables.

(**) Essentiellement chez les Fluviales, les Lemnacées et les Cypéracées.

Les chiffres sont suffisamment voisins de ceux signalés pour les Dicotylédones en général pour qu'aucune conclusion n'en puisse être dégagée.

Enfin, si nous considérons chez les Dicotylédones à C-glycoflavones les espèces ligneuses d'une part, herbacées de l'autre, la répartition relevée (40 à 60% respectivement) ne laisse là non plus aucune possibilité d'interprétation dans un sens ou dans l'autre.

Compte-tenu de ces diverses considérations, quelles conclusions peuvent être tirées de la signification taxinomique et phylogénique des C-glycoflavones ? Corrélativement, quel degré d'avancement (biochimique) peut-on accorder aux Fluviales ?

Tentons tout d'abord de conclure en ce qui concerne la position des Fluviales, considérée à la lumière de leur contenu flavonique.

Dans la mesure où les "principes évolutifs" énoncés à partir des Dicotylédones peuvent être appliqués aux Monocotylédones, les Fluviales nous apparaissent donc comme un groupe qui, morphologiquement ancien (Th. ECKARDT, dans Engler's Syllabus, p. 498), possède un chimisme flavonique évolué (rareté des leucoanthocyanes et des flavonols ; absence totale de dérivés phényltrihydroxylés ; relative abondance de flavones). Ce chimisme des Fluviales (sans considérer les C-glycoflavones) est en accord avec l'opinion de BATE-SMITH, selon qui une telle répartition des composés polyphénoliques est surtout liée à l'habitus herbacé.

En ce qui concerne la C-glycosylation, la fréquence de tels composés chez les Fluviales semble en relation avec l'habitat aquatique, comme nous l'avons vu. D'un point de vue phylogénique, nous pourrions être de l'avis de HARBORNE (1967), pour qui ces composés sont un indice primitif, dans la mesure où les caractères morphologiques et anatomiques des Fluviales sont considérés comme peu évolués par la majorité des botanistes. Mais il est alors surprenant de constater qu'il y a une corrélation positive entre la distribution des C-glycoflavones et celle des O-glycoflavones considérées comme évoluées, ainsi qu'une anticorrélation des C-glycoflavones et des polyphénols primitifs que sont leucoanthocyanes, flavonols et dérivés phényltrihydroxylés. Faut-il admettre, comme VOIRIN l'a déjà suggéré pour les Ptéridophytes (82), que la signification phylogénique des flavonoïdes puisse être différente dans chacune des deux classes d'Angiospermes ?

En fait, toute tentative d'interpréter davantage les documents biochimiques actuels peut-être insuffisants vu le nombre d'espèces analysées bute contre le problème botanique général (dont l'exemple traité n'est peut-être qu'un reflet) de la validité systématique et de la position phylogénique des Monocotylédones, de la signification des habitus ligneux et herbacé, des milieux terrestre et aquatique (primitifs, évolués, sur-évolués ?)

En tenant compte de la réserve des botanistes classiques devant ces problèmes, on pardonnera sans doute à la phytochimie de n'avoir pu éclairer davantage la question qui lui était ici posée.

(*) N'oublions pas qu'une même C-glycosylflavone pourrait éventuellement ne pas présenter la même signification chez deux espèces différentes, dans la mesure où le processus biochimique assez particulier que constitue la C-glycosylation, se situerait à un stade précoce (phényl-propane) ou avancé (squelette en C₁₅) de la biogénèse flavonique ; les données biochimiques sont encore insuffisantes à ce sujet.

CONCLUSION

Le choix du "phylum" des Fluviales (ou Hélibées) comme matériel d'étude flavonique a été basé sur des raisons chimiques et taxinomiques ; nous nous sommes proposée d'apporter ici notre contribution à une connaissance plus approfondie de ces deux domaines.

Nous avons consacré un premier chapitre à une mise au point des différentes méthodes d'analyse actuellement utilisées. Si le traitement hydrolytique des pigments flavoniques n'a guère été développé ici, une modification concernant l'extraction, puis la purification et l'étude des C-glycosylflavones a plus particulièrement retenu notre attention.

Ce nouveau type de composés identifiés, de plus en plus fréquemment, peut donc dès à présent être rapidement mis en évidence sans s'écarter beaucoup de la technique habituelle.

D'autre part, en ce qui concerne les flavones aglycones, nous pensons avoir fourni des critères nets pour distinguer lutéoline, chrysoérol et diosmétine, par examen comparatif de leurs spectres UV et par révélation chromatographique avec le réactif de Bénédict.

Le deuxième chapitre traite du contenu flavonique particulier de Potamogeton natans L. Il renferme les différentes méthodes d'identification de la lutéoline et du chrysoérol, ainsi que des deux séries d'isomères mono-C-glucosylés de chacune des flavones précitées.

La fin de ce chapitre est une ébauche d'étude de deux composés nouveaux, mis en évidence après hydrolyse acide, et dont nous pensons avoir trouvé les "prédécesseurs" à l'état naturel. Malgré la quantité déjà importante de renseignements obtenus, nous avons dû interrompre ces recherches qui se poursuivent dans le laboratoire de Monsieur le Professeur CHOPIN.

Le troisième chapitre résume l'ensemble des données bibliographiques et des résultats personnels concernant la biochimie des Hélibées (ou Fluviales). Chez les Alismatales, nous avons parfois rencontré des difficultés pour identifier les aglycones libérés par hydrolyse. Nous aurions aimé clarifier quelques problèmes concernant, par exemple, l'éventuelle présence d'aurone chez Sagittaria sagittifolia, ainsi que la nature des aglycones fluorescents de Butomus umbellatus.

Nous avons évoqué aussi le problème des différentes "orientines" d'Alisma plantago, Sagittaria sagittifolia, comparées à celle de Potamogeton natans ; peut-être la nature du sucre est-elle en cause. Ces problèmes ne sauraient être résolus que par synthèse, (Laboratoire du Professeur CHOPIN, échantillons préparés par M.L. BOUILLANT). Citons encore le problème des C-glycosides d'Elodea canadensis.

Le dernier chapitre aborde l'utilisation des pigments flavoniques d'un point de vue chimiotaxinomique et phylogénétique ; bien que notre échantillonnage soit loin d'être complet, nous pensons apporter notre contribution à une classification des Hélibées basée sur des critères chimiques.

Le phylum se montre homogène par sa richesse en flavones et C-glycoflavones, sa rareté en flavonols et en leuco-anthocyanes, l'absence enfin de dérivés phényl-trihydroxylés ; nous ne reviendrons pas sur les résultats un peu plus nuancés obtenus en envisageant successivement chaque famille. Les Hélibées s'inscrivent bien dans le contexte plus général des Monocotylédones, où Graminées et Spathiflores, par exemple, se signalent également par leur richesse en flavones et leur pauvreté en flavonols.

En regard des principes phylogénétiques communément admis, les Fluviales apparaissent au sein des Monocotylédones comme un groupe morphologiquement ancien à caractère chimique évolué (les Potamogetonales seraient flavoniquement la plus évoluée du groupe) ; sous cet angle, les Fluviales pourraient être rapprochées plutôt des Cypéales et des Graminales.

On peut évoquer enfin la question de la signification particulière, physiologique et taxinomique, des C-glycosylflavones. Si leur présence est en relation, nous semble-t-il, avec l'habitat aquatique, nous n'avons pu trancher du point de vue phylogénétique entre les deux solutions suivantes :

- ou bien, leur aglycone étant très fréquemment une flavone, les C-glycosides sont-ils caractéristiques de plantes évoluées ;
- ou bien, les C-glycoflavones se rencontrant aussi bien chez des Mousses, des Algues, des Fougères.... que dans les deux classes d'Angiospermes, ont-elles plutôt un caractère primitif ou, plus exactement, relictuel.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) P. LEBRETON, M. JAY et B. VOIRIN, *Chim. Anal. Fr.*, 1967, 49, 375-383.
- (2) E.C. BATE-SMITH, *Biochem. J.*, 1954, 58, 122.
- (3) B. WINICKI, A. CIER, J. CHOPIN et C. NOFFRE, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, 27, 1639.
- (4) R.M. HOROWITZ et B. GENTILI, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 11, 2803.
- (5) A. MAURICE et C. MENTZER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 369.
- (6) L. JURD et R.M. HOROWITZ, *Spectral Properties of Flavonoid Compounds*, in
T.A. GEISSMAN: "The Chemistry of Flavonoid Compounds", Pergamon Press, 1962.
- (7) H. COMBIER, Thèse, 1968, n° 60, Lyon.
- (8) L. JURD et R.M. HOROWITZ, *J. Org. Chem.*, 1957, 22, 1618.
- (9) L. JURD ; *Phytochem.*, 1969, 8, 445.
- (10) K.R. MARKHAM et T.J. MABRY, *Phytochem.*, 1968, 7, 1197.
- (11) T.J. MABRY, K.R. MARKHAM et M.B. THOMAS, "The Systematic Identification of Flavonoïds", Springer Verlag, Berlin et New-York, 1970.
- (12) M. PARIS, *Pl. Méd. et Phyto.*, 1968, 11, 32.
- (13) L.J. BELLAMY, "The IR Spectra of Complex Molecules", Methuen, London, 1958.
- (14) B. VOIRIN, Thèse, 1970, n° 648, Lyon.
- (15) H. AUDIER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1966, 9, 2892.
- (16) A. PROX, *Tetrahedron*, 1968, 24, 3697.
- (17) B. GENTILI et R.M. HOROWITZ, *J. Org. Chem.*, 1968, 33, 1571-76.
- (18) W.E. HILLIS et D.H.S. HORN, *Austr. J. Chem.*, 1965, 18, 531-42.
- (19) R.A. EADE, W.E. HILLIS, D.H.S. HORN et J.J.H. SIMES, *Austr. J. Chem.*, 1965, 18, 715.
- (20) J.W. WALLACE, T.J. MABRY et R.E. ALSTON, *Phytochem.*, 1969, 8, 95.
- (21) T.A. GEISSMAN, "The Chemistry of Flavonoïd Compounds", Pergamon Press, London, 1962.
- (22) A.G. PERKIN, *J. Chem. Soc.*, 1896, 69, 206 ; cité dans GEISSMAN.
- (23) F.B. POWER et F. TUTIN, *Process. Am. Pharm. Assoc.*, 1906, 54, 352 ; cité dans GEISSMAN.
- (24) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et F. GLOGGENGIESSER, *Arch. Pharm.*, 1958, 291, 126-137; cité dans GEISSMAN.
- (25) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et H.S. DHINGRA, *Arch. Pharm.*, 1959, 292, 83-89.
- (26) B.H. KOEPPEN, C.J.B. SMIT et D.G. ROUX, *Biochem. J.*, 1962, 83, 507.
- (27) M.K. SEIKEL, A.J. BUSHNELL et R. BIRZGALIS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 99, 451-57.
- (28) J. CHOPIN, A. DURIX et M.L. BOUILLANT, *C.R. Acad. Sc. ; Paris*, 1968, 266, 1334 (série C).
- (29) J. STENHOUSE, *Ann. Chem.*, 1851, 78, 15.
- (30) A.G. PERKIN, *Proc. Chem. Soc.*, 1900, 77, 422.
- (31) R.R. PARIS et A. STAMBOULI, *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1961, 252, 1659.
- (32) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et P. BEYERSDORFF, *Naturwissenschaften*, 1964, 51, 310.
- (33) J. CHOPIN, dans "Actualités de Phytochimie Fondamentale", 2ème série, 1966, sous la direction de C. MENTZER, Masson et Cie, Paris.
- (34) F.W.Mc. LAFFERTY, *Spectrographie de Masse*, Edition Française : J. GORE, Ediscience, Paris, 1969.
- (35) A. GROUILLER, Thèse, 1965, n° 367, Lyon.
- (36) J.B. HARBORNE, V.H. HEYWOOD et N.A. SALEH, *Phytochem.*, 1970, 4, (1), 2011.
- (37) J.B. HARBORNE, *Phytochem.*, 1963, 2, 327.
- (38) J.B. HARBORNE, *Phytochem.*, 1965, 4, (1), 107.
- (39) E. LEDERER, *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique*, tome III, Masson et Cie, Paris, 1960.
- (40) R. HEGNAUER, "Chemotaxonomy der Pflanzen", vol. II, Birkhäuser, Bâle, 1962.
- (41) H. REZNIK et R. NEUHAUSEL, *Z. Botan.*, 1959, 47, 471.
- (42) W. KARRER et E. JUCKER, "Carotinoïds" Birkhäuser, Bâle, 1948.

- (43) C.F. VAN BEUSEKOM, *Phytochem.*, 1967, 6, (4), 573.
- (44) S. PRAT et Th. LIPPMAA, *Schriften herausgegeben von den Naturforsch. Ges. bei der Universität Tartu*, 1925.
- (45) J.B. HARBORNE, "Phytochemical Phylogeny", Academic Press, London, 1970.
- (46) A. ARBER, "Water-plants : A Study of Aquatic Angiosperms", University Press, Cambridge, 1920.
- (47) B.A. RUBIN et L.N. LOGINOVA, *Fisiol. Rast.*, 1965, 12, 386.
- (48) J.B. PRIDHAM, *Phytochem.*, 1964, 3, 493.
- (49) L. JURD, T.A. GEISSMAN et M.K. SEIKEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, 67, 284.
- (50) J.W. WALLACE, comm. personnelle, 1969.
- (51) H. FLUCK, dans "Chemical Plant Taxonomy" (T. SWAIN), Academic Press, New-York and London, 1963, 167.
- (52) H. TATSUTA et Y. OCHII, *Sci. Rep. Tohoku Univ. ser. I*, 1956, 39, 236.
- (53) E.C. BATE-SMITH et T. SWAIN, *Lloydia*, 1965, 28, 313.
- (54) H.L. LI et J.J. WILLAMAN, *Econ. Bot.*, 1968, 22, 239.
- (55) E.C. BATE-SMITH, *Phytochem.*, 1968, 7, 459.
- (56) J.W. Mc CLURE et R.E. ALSTON, *Am. J. Bot.*, 1966, 53, 849.
- (57) K.V. THIMANN et Y.H. EDMONDSON, *Arch. Biochem.*, 1949, 22, 33.
- (58) M. FURUYA et K.V. THIMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1964, 108, 109.
- (59) J.W. WALLACE, T.J. MABRY et R.E. ALSTON, *Phytochem.*, 1969, 8, 93.
- (60) J.W. WALLACE et R.E. ALSTON, *Pl. Cell. Physiol.*, 1966, 7, 699.
- (61) J.W. Mc CLURE, *Pl. Physiol.*, 1968, 43, 193.
- (62) P. RIBEREAU-GAYON, Thèse, 1959, Paris.
- (63) M. JAY, Thèse, 1969, n° 511, Lyon.
- (64) J.B. HARBORNE, "Biochemistry of Flavonoïd Compounds", Academic Press, London, 1964, p. 64.
- (65) J. SHINODA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 1928, 48, 214 ; cité dans "Les Couleurs des Fleurs et des Fruits" (Ch. SANNIE et H. SAUVAIN), Editions du Museum, Paris, 1952.
- (66) A.G. PERKIN, *J. Chem. Soc.*, 1898, 73, 1019.
- (67) G. BENTHAM et J.D. HOOKER, "Genera Plantarum", vol. III, Londres, 1883.
- (68) R. WETTSTEIN, "Handbuch der Systematischen Botanik", Leipzig und Wien, 1935 ; reprint Amsterdam, 1962.
- (69) A. TAKHTAJAN, "Die Evolution der Angiospermen", Jena, 1959.
- (70) J. HUTCHINSON, "The Genera of Flowering Plants", 2ème édit., vol. I, Oxford University Press, London, 1959.
- (71) L. EMBERGER, "Les Végétaux Vasculaires", tome II, Masson et Cie, Paris, 1960.
- (72) Th. ECKARDT (A. ENGLER's) "Syllabus der Pflanzenfamilien", band II, 12ème édit., Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1964.
- (73) J.P. LOTSY, "Lehrbuch der Pflanzen Systematik", 3ème vol. Jena, 1911.
- (74) R. LETOUBLON, *Diplôme d'Etudes Supérieures*, 1968, Lyon.
- (75) C. PHOUPHAS, *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1956, 242, 1641.
- (76) E.C. BATE-SMITH, *J. Linn. Soc. (Bot.)*, 1968, 60 (383), 325.
- (77) E.C. BATE-SMITH, *J. Linn. Soc. (Bot.)*, 1962, 58 (371), 95.
- (78) E.C. BATE-SMITH, *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 1956, 27, 165.
- (79) C.A. WILLIAMS, J.B. HARBORNE et H.T. CLIFFORD, *Phytochem.*, 1971, 10, 1059.
- (80) J.B. HARBORNE, *Phytochem.*, 1971, 10, 1569.
- (81) J.B. HARBORNE, "Comparative Biochemistry of the Flavonoïds", Academic Press, London, 1967.
- (82) B. VOIRIN et Ph. LEBRETON, *Boissiera*, 1971, 19, 259-67.

TABLE DES MATIERES

- Introduction	page 9
- Chapitre I : MATERIEL ET TECHNIQUES.	11
I - 1. Matériel biologique.	11
I - 2. Techniques chimiques.	13
I - 2. 1. Techniques de l'analyse flavonique.	13
I - 2. 2. Mode opératoire ; analyse "de routine".	25
- Chapitre II : LES FLAVONOIDES DE <u>POTAMOGETON NATANS</u> .	29
II - 1. Schémas d'isolement.	29
II - 1. 1. Introduction.	29
II - 1. 2. Hydrolyse acide.	30
II - 1. 3. Extraction non hydrolytique.	33
II - 2. Flavonoïdes mis en évidence.	35
II - 2. 1. Aglycones.	35
II - 2. 2. C-glucosyl-flavones.	39
II - 2. 3. "X" et "Pro-X".	51
- Chapitre III : RESULTATS CHIMIQUES CONCERNANT LES FLUVIALES.	69
III - 1. Données bibliographiques.	69
III - 2. Données expérimentales.	75
III - 2. 1. Leucoanthocyanes et anthocyanes.	75
III - 2. 2. Aglycones flavoniques.	80
III - 2. 3. C-glucosyl-flavones.	87
- Chapitre IV : RESULTATS TAXINOMIQUES.	93
IV - 1. Problèmes taxinomiques posés par les Fluviales.	93
IV - 1. 1. Définition des Fluviales.	93
IV - 1. 2. Problèmes internes.	93
IV - 1. 3. Relations des Fluviales avec les ordres voisins :	96
- relations avec d'autres Monocotylédones ;	96
- relations avec des Dicotylédones.	96
IV - 2. Résultats flavoniques.	96
IV - 2. 1. Tableau récapitulatif des résultats expérimentaux	97
IV - 2. 2. Commentaires.	100
IV - 2. 2. 1. Définition flavonique de l'ordre des Fluviales.	100
IV - 2. 2. 2. Définition flavonique au niveau des familles.	101
IV - 2. 2. 3. Rapprochements avec d'autres taxons.	101
IV - 3. Discussions des résultats	102
IV - 3. 1. A l'intérieur des Fluviales.	102
IV - 3. 2. Chez les Monocotylédones.	103
IV - 3. 3. Au sein des Angiospermes.	104
IV - 3. 3. 1. Caractères flavoniques en général.	104
IV - 3. 3. 2. Signification des C-glycoflavones.	105
- Conclusions générales.	111
- Références bibliographiques.	113

Vu
Les Membres du Jury,

R. KUHNER
Ph. LEBRETON
J. CHOPIN
P. BERTHET

Vu et approuvé
Le Directeur de l'U.E.R. des Sciences
de la Nature

L. DAVID

Vu et accordé le permis d'imprimer

LYON, le 4 Mai 1972

Le Président de l'Université Claude Bernard,

J. BOIDIN

